

CARLA FERNANDA PICCOLI

Análise de mutações no fragmento do gene que expressa a proteína transmembrana de canal de sódio (*kdr*) e da suscetibilidade a inseticidas em populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

**CURITIBA
2010**

CARLA FERNANDA PICCOLI

Análise de mutações no fragmento do gene que expressa a proteína transmembrana de canal de sódio (*kdr*) e da suscetibilidade a inseticidas em populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva.

Co-orientador: Prof. Dr. Jonny E. Duque Luna.

**CURITIBA
2010**

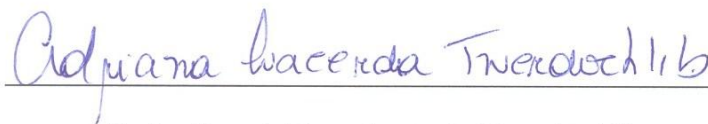
CARLA FERNANDA PICCOLI

“Análise de mutações no fragmento do gene que expressa a proteína transmembrana de canal de sódio (*kdr*) e da suscetibilidade a inseticidas em populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).”

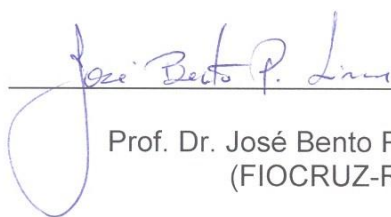
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Professor. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva (Orientador)
(UFPR)



Profa. Dra. Adriana Lacerda Twerdochlib
(PÓS-DOC/FIOCRUZ-RJ)



Prof. Dr. José Bento Pereira Lima
(FIOCRUZ-RJ)

Curitiba, 11 de agosto de 2010.

Aos meus pais, irmã e namorado, por todo carinho e apoio.

Aos amigos e toda equipe do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, pela amizade e auxílio.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Doraci Piccoli e Adolar Gilberto Piccoli, e minha irmã Ana Paula Piccoli por toda paciência e incentivo. Aos tios, primos e demais familiares, por sempre acreditarem na minha escolha e mostrarem que ela foi motivo de orgulho.

Ao meu orientador, Professor Doutor Mário Antônio Navarro da Silva, por todo o seu apoio, conversas e encorajamento; e ao meu co-orientador Jonny Edward Duque Luna, presente desde o início dos estudos, por todas as idéias, dicas e conversas.

Aos doutores José Bento Pereira Lima, Denise Valle e Ademir Martins, pelas conversas, auxílio, sugestões e oportunidade em participar do Curso de Metodologias de Avaliação de Resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas.

A todos os membros do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, pelos conselhos e ajuda prestada, em especial para:

Ana Caroline Dalla Bona, cujo apoio foi fundamental para a finalização deste projeto. Pela parceria em todos os momentos, conversas, broncas, puxões de orelha, e principalmente, toda amizade, carinho e auxílio que me prestou e ainda presta.

Betina Westphal, Daniel de Lima Bellan, Gisele de Moraes, Isabel Assumpção, Lisiane de Castro Poncio, Mário Luis Pessoa Guedes, Rodrigo Faitta Chitolina, Selene Círio Leite e Sullamy D. Gomes Aciole, que sempre estiveram dispostos a ajudar, pela companhia, viagens e auxílio, não apenas na vida acadêmica, mas fora dela.

Às pessoas muito especiais, que dentro ou fora da Universidade, foram inestimáveis para a finalização do projeto: Álvaro Borba, André Barbosa, Daniel Moura, Daiara Manfio, David Luz, Fátima Nishimori, Fernando Leivas, Geraldo Júnior, Karine Vairo, Laércio Neto, Rafael Sandoval, Rodrigo Correa e tantos

outros; muito obrigada pelo companheirismo, carinho e apoio nos bons e maus momentos.

À Secretaria Estadual de Saúde do Paraná, pela coleta dos materiais.
Ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Foz do Iguaçu pela coleta dos materiais, especialmente ao Dr. André S. Leandro, Rosinei Kafka e Sebastião J. Oliveira.

Ao CNPq, cuja bolsa possibilitou a realização deste projeto.

Aos membros da banca, que gentilmente cederam seu tempo e conhecimento para correções e aprimoramento deste trabalho!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Países/Áreas com risco de transmissão de dengue no ano de 2008, de acordo com a Organização Mundial da Saúde.	16
Figura 2 - Distribuição dos três planaltos paranaenses.	18
Figura 3 - Temperaturas médias anuais registradas para o Estado do Paraná.	18
Figura 4 - Grau de urbanização do Estado do Paraná no ano de 2007.	18
Figura 5 - Estrutura química do larvicida organofosforado temefós, de nome químico O, O-(ditio-4,1fenileno) bis (O, O-dimetilfosforotioato); O, O'(ditio-4,4-fenileno) O, O, O', O', tetrametil bis fosfotioato.	20
Figura 6 - Estruturas químicas da a) Cipermetrina ($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$) e b) Delametrina ($C_{22}H_{19}Br_2NO_3$).	22
Figura 7 - Esquema do canal de sódio voltagem dependente, seus quatro domínios homólogos e suas seis subunidades hidrofóbicas.	24
Figura 8 - Mapa do Brasil, com destaque para o Estado do Paraná e os doze municípios analisados para ocorrência de populações de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	28
Figura 9 - Armadilha de oviposição e início do processo de criação: a) ovitampa, b) paleta, c) detalhe da paleta com ovos, d) recipientes com paletas, água desclorada e ração para estimular a eclosão dos ovos.	32
Figura 10 - Processo de criação para obtenção de larvas para realização dos bioensaios: a) larvas e pupas, b) recipiente com pupas e adultos, c) identificação de adultos, d) diferenças morfológicas entre <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> (Florida Medical Entomology Laboratory, 1999), e) gaiolas para criação de adultos, f) oviposição.	32
Figura 11 - Esquema do ensaio para calibração da colônia suscetível Rockefeller de <i>Aedes aegypti</i>	34
Figura 12 – Esquema do ensaio dose resposta para as populações de campo de <i>Aedes aegypti</i>	35
Figura 13 – Mapa do Paraná, com destaque para os cinco municípios avaliados para a presença da mutação no códon 1016.	38
Figura 14 - Mapa do Brasil, com destaque para o Estado do Paraná e o Município de Foz do Iguaçu, cujos estratos foram agrupados em cinco regiões.	38
Figura 15. Verificação da amplificação do fragmento do gene que confere resistência a piretróides, na qual uma banda de 98bp indica homozigoto recessivo (aa - mutante), uma banda de 78 bp indica homozigoto dominante (AA - selvagem) e as duas bandas indicam heterozigoto.	42
Figura 16 - Frequências dos alelos selvagem (Val) e mutante (Ile) para a mutação no códon 1016 do fragmento do gene do canal de sódio de <i>Aedes aegypti</i> nas cinco regiões de Foz do Iguaçu.	49
Figura 17 – Frequências dos alelos selvagem (Val) e mutante (Ile) para a mutação no códon 1016 do fragmento do gene do canal de sódio de <i>Aedes aegypti</i> . nos cinco municípios do Estado do Paraná avaliados.	50
Figura 18 - Classificação dos municípios segundo incidência por 100.000 habitantes – Paraná 2010 (Boletim informativo dengue n° 4/2010) e mapa dos municípios avaliados (em detalhes na figura 8).	52

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Caracterização dos municípios, suas respectivas regionais de saúde, população, número de casos confirmados, notificados e incidência.....	29
Tabela II – Municípios avaliados e seus respectivos núcleos regionais, meses relacionados aos períodos de instalação e posição em relação aos planaltos paranaenses.....	31
Tabela III – Critério para avaliação da suscetibilidade a partir da mortalidade observada com a Dose Diagnóstica.	36
Tabela IV- Relação das extrações de DNA utilizadas para realização de PCR, referentes a diferentes municípios do estado do Paraná.	39
Tabela V - Relação de mosquitos separados para extração de DNA, referentes às regiões de Foz do Iguaçu.	39
Tabela VI – Municípios do Estado do Paraná e respectivos números de ovitrampas instaladas, ovitrampas positivas, tempo máximo de armazenamento (sob condições de laboratório), número total de ovos, adultos e porcentagem de eclosão de <i>Aedes</i> spp.	44
Tabela VII - Municípios do Estado do Paraná e respectivos números e adultos, espécies, sexagem e razão sexual de <i>Aedes</i> spp.....	45
Tabela VIII - Bioensaios com a dose diagnóstica 0,0162mg/L (calibrada com a cepa Rockefeller) em larvas de <i>Ae. aegypti</i> provenientes dos municípios de Cianorte, Maringá e Paranavaí	47
Tabela IX - Municípios do Estado do Paraná avaliados, geração utilizada, concentrações letais (mg/L) e respectivos intervalo de confiança, chi-quadrado e razão de resistência (RR ₅₀ e RR ₉₅) em populações em <i>Aedes aegypti</i>	47
Tabela X – Regiões de Foz do Iguaçu com número de espécimes analisados e frequências genotípicas de <i>Aedes aegypti</i>	48
Tabela XI – Municípios avaliados com respectivos números de espécimes analisados e frequências genotípicas de <i>Aedes aegypti</i>	48
Tabela XII - Regiões de Foz do Iguaçu com respectivas frequências dos alelos selvagem (Val) e mutante (Ile) para a mutação no códon 1016 do fragmento do gene do canal de sódio de <i>Aedes aegypti</i>	49
Tabela XIII - Municípios avaliados com respectivas frequências dos alelos selvagem (Val) e mutante (Ile) para a mutação no códon 1016 do fragmento do gene do canal de sódio de <i>Aedes aegypti</i>	50
Tabela XIV - Valor preditivo das frequências alélicas, de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg. Sendo p = frequência de A e q = frequência de a.	56
Tabela XV - Frequências genotípicas estimadas após uma geração de acasalamento ao acaso de <i>Aedes aegypti</i> para as regiões de Foz do Iguaçu.	56
Tabela XVI - Frequências genotípicas estimadas após uma geração de acasalamento ao acaso de <i>Aedes aegypti</i> para os municípios paranaenses.....	56

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

< - menor que
 > - maior que
 µL – microlitros
 A - Adenina
 a – representação do alelo mutante Ile
 A – representação do alelo selvagem Val
 AChE – Acetilcolinesterase
 Af - Clima tropical superúmido
 bp – pares de base
 C - Citosina
 Cfa – Clima subtropical com verão quente
 Cfb – Clima temperado com verão ameno
 CL – Concentração letal
 DD – Dose Diagnóstica
 dNTP - Desorribonucleotídeos Trifosfatados
 DR – Dose Resposta
 EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
et al. - e outros
 FHD – febre Hemorrágica do Dengue
 G –Guanina
 GABA – ácido gama-aminobutírico
 IC – Intervalo de confiança
 Ile – isoleucina
kdr – knockdown resistance
 Leu - Leucina
 M – Molar
 MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
 mg/L – miligramas por litro
 mL – mililitros
 n – número
 Na_v – Canal de Sódio voltagem-dependente
 OP – Organofosforados
 PCR – Reação de Polimerização em Cadeira
 PEAA – Plano de Erradicação do *Aedes aegypti*
 Phe – Fenilalanina
 ppm – partes por milhão
 PR – Paraná
 rpm – rotações por minuto
 RR – razão de resistência
 SCD – Síndrome do Choque do Dengue
 SDS - Dodecilo Sulfato de Sódio
 SESA – Secretaria de Saúde do Estado
 T – Timina
 TBE – Tris Hidroclorato + Borato + EDTA
 TE – Tris Hidroclorato + EDTA
 Val – valina
 X² - Chi quadrado

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 A dengue e o <i>Aedes aegypti</i>	14
1.2 Dengue no Brasil e no Paraná.....	16
1.3 Inseticidas e mecanismos de ação	19
1.4 Mecanismos de resistência	22
1.5 <i>Kdr – Knockdown Resistance</i>	23
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Área de estudo	27
4.2 Caracterização dos municípios analisados.....	27
4.3 Estabelecimento e manutenção das colônias de insetos.....	30
4.4 Bioensaio para verificar a suscetibilidade de mosquitos ao temephos.....	33
4.5 Análise estatística	36
4.6 Amostras para extração de DNA	37
4.8 Quantificação do DNA	40
4.9 Amplificação gênica alelo específica do gene KDR	40
4.10 Verificação da amplificação do gene KDR.....	41
4.11 Cálculos das frequências genotípicas e alélicas	42
5. RESULTADOS	43
5.1 Bioecológicos	43
5.2 Dose diagnóstica, dose resposta e razão de resistência	46
5.2.1 Cianorte	46
5.2.2 Maringá.....	46
5.2.3 Paranavaí	46
5.3 Amplificação do códon 1016.....	47
6. DISCUSSÃO	51

6.1 Bioecológicos	51
6.2 Dose diagnóstica, dose resposta e razão de resistência	53
6.3 Amplificação do códon 1016.....	55
7. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS.....	68
1- Extração.....	68
2 – Preparo gel poliacrilamida para verificação da amplificação do gene KDR.....	69
3- Fotos resultantes das PCRs realizadas.....	70
4-Tabelas relacionando insetos extraídos e respectivos genótipos e fenótipos encontrados (listados apenas para as reações que geraram resultados).	76

RESUMO

O uso continuado de inseticidas químicos ocasiona uma intensa pressão de seleção, acarretando problemas para os programas de controle de vetores. O termo “*Knockdown Resistance*” (*kdr*) é aplicado a insetos que perdem sua coordenação imediatamente após a exposição ao inseticida, recuperando-se após o seu efeito; sendo frequentemente causado por mutações de caráter recessivo Val1016Ile no canal de sódio voltagem dependente. Este trabalho teve como objetivos levantar dados e avaliar a suscetibilidade de larvas de 3º instar final e 4º inicial ao inseticida temephos, e verificar a presença da mutação Val1016Ile, que confere a resistência a adulticidas piretróides, em populações do Estado do PR. Foram recebidos ovos de 12 municípios paranaenses (Cianorte, Floraí, Guaíra, Ibaiti, Iguatu, Ivaiporã, Loanda, Londrina, Maringá, Nova Londrina, Paranavaí e Pitanga). Bioensaios para verificar a suscetibilidade ao temephos, estimando os valores das CL₅₀, CL₉₅, RR₅₀ e RR₉₅ foram realizados apenas para as populações de *Aedes aegypti* de Cianorte, Maringá e Paranavaí. A partir da calibração com a linhagem suscetível Rockefeller, foram estabelecidas oito concentrações do organofosforado, com quatro réplicas, tanto para as populações avaliadas como para o controle. A presença da mutação no códon 1016 foi verificada nos municípios de Floraí, Loanda, Londrina, Paranavaí e Foz do Iguaçu, sendo o último dividido em cinco regiões (Norte, Sul, Leste, Oeste e Central) devido a sua localização em área de tríplex fronteira. Para análises moleculares foram utilizados três iniciadores na técnica PCR alelo específico: um para o alelo mutante, um para o selvagem, e um terceiro específico da região conservada e comum a ambos. A verificação da amplificação foi realizada com eletroforese em gel de poliacrilamida, no qual a presença de uma banda 98bp indica homozigoto mutante (resistente), a presença de uma banda 78bp indica homozigoto selvagem (suscetível) e a presença de duas bandas indica heterozigoto (suscetível). A criação em laboratório resultou em 5857 adultos, sendo 4267 *Aedes aegypti* e 1586 *Aedes albopictus*. O número de paletas positivas variou de 2,0% a 100% e a taxa de eclosão oscilou entre 0 e 87,5%. A relação entre sexos aproximou-se do esperado (1:1) em todas as localidades para ambas as espécies. Os resultados a partir da concentração diagnóstico indicam que a amostra de Cianorte está com a suscetibilidade alterada, enquanto Maringá e Paranavaí estão resistentes. As razões de resistência (RR₉₅) foram 3,56; 7,18 e 3,97; respectivamente. A presença da mutação Val1016Ile em todos os municípios avaliados sugere que o uso de piretróides está expondo as populações a intensas pressões de seleção. O predomínio de heterozigotos, observado em quase todas as regiões, pode elevar a frequência de indivíduos mutantes (resistentes) nas próximas gerações. O acompanhamento das populações deve ser feito de modo contínuo, a fim de detectar prontamente qualquer alteração no status de suscetibilidade e aumento na frequência da mutação. Informação a respeito da resistência é imprescindível para auxiliar nos programas de controle de vetores, podendo ser utilizada na indicação de metodologias alternativas, visando manter e restaurar a eficácia dos inseticidas químicos.

Palavras-chave: **Resistência, vetores, dengue, piretróides, Val1016Ile**

ABSTRACT

Continued use of chemical pesticides has led populations to an intense selection pressure, causing problems for vector control programs. The term "*Knockdown Resistance*" (*kdr*) is applied to insects that lose their coordination immediately after exposure to insecticide, recovering after its end; is frequently caused by recessive mutations in Val1016Ile voltage-gated sodium channel. This study aimed to gather data and evaluate the susceptibility of third instar larvae to the insecticide temephos and to verify the presence of Val1016Ile mutation, which confers resistance to pyrethroid adulticide in populations of the State of Paraná. Eggs were received from 12 municipalities of PR (Cianorte, Floraí, Guaira, Ibaiti, Iguatu Ivaiporã, Loanda Londrina, Maringa, New London, and Paranavaí Pitanga). Bioassays to determine the susceptibility to temephos, estimating the values of LC_{50} , LC_{95} , RR_{50} and RR_{95} were performed only for *Aedes aegypti* populations of Cianorte, Maringa and Paranavaí. From the calibration with the susceptible strain Rockefeller, were established eight concentrations of the organophosphate, with four replicates for all populations evaluated, as well as the control. The presence of the mutation at codon 1016 was verified for the municipalities of Floraí, Loanda Londrina, Paranavaí and Foz do Iguaçu, which was divided into five regions (North, South, East, West and Central) due to its location in the triple border area. For molecular analysis, three primers were used in allele-specific PCR: one for the mutant allele, one to the wild, and a third specific for the conserved region, common to both. Verification of the amplification was performed with polyacrylamide gel electrophoresis, in which the presence of a 98bp band indicates mutant homozygous (resistant), the presence of a 78bp band indicates wild homozygous wild (susceptible) and the presence of two bands indicates heterozygous (susceptible). Laboratory rearing resulted in 5857 adults, 4267 *Aedes aegypti* and 1586 *Aedes albopictus*. The number of positive palettes ranged from 2.0% to 100% and hatching rate varied between 0 and 87.5%. The relationship between the sexes approached the expected (1:1) at all locations for both species. The results from the diagnostic dose indicate that the sample of Cianorte has altered susceptibility, while Maringa and Paranavaí are resistant. The resistance ratios (RR_{95}) were 3.56, 7.18 and 3.97, respectively. The presence of the Val1016Ile mutation in all municipalities evaluated suggests that the use of pyrethroids is exposing populations to intense selection pressures. The predominance of heterozygotes observed in almost all regions, can increase the frequency of mutant individuals (resistant) in the next generations. Monitoring of populations should be done continuously in order to promptly detect any change in susceptibility status and any increase in mutation frequency. Information on resistance is essential to assist vector control programs, and can be used to establish alternative methodologies to maintain and restore the effectiveness of chemical insecticides.

Keywords: Resistance, vectors, dengue, pyrethroid, Val1016Ile

1. INTRODUÇÃO

1.1 A dengue e o *Aedes aegypti*

Entre as doenças virais de transmissão vetorial, a dengue é a que atualmente causa maior impacto na população em termos de morbimortalidade (Gubler, 2002; Tauil, 2002). Apesar de ser conhecida a mais de dois séculos e das informações acumuladas nos últimos anos, esta arbovirose continua sendo um dos principais problemas e uma das prioridades da Saúde Pública do século atual, exigindo esforços e investimentos cada vez mais intensos (Periago & Gúzman, 2007).

Seu agente etiológico é um retrovírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, que inclui os organismos causadores da febre amarela, febre do oeste do Nilo e encefalite japonesa (Tauil, 2001; Carroll *et al.*, 2007). São conhecidos quatro sorotipos antigenicamente distintos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (Sabin, 1952; Schlesinger & Frenkel, 1956; Hammon & Sather, 1960). Todos os sorotipos podem infectar diversos tipos de células em homens e outros primatas, mas apenas o primeiro apresenta manifestações clínicas da doença (Borges, 2001; Seneviratne, 2006).

Estimativas indicam que 2,5 bilhões de pessoas (dois terços da população mundial) encontram-se em áreas de risco para contrair a infecção (Figura 1), sendo que mais de 100 milhões são acometidas pela doença anualmente (WHO, 1997; Wilder-Smith & Schwartz, 2005). As manifestações mais graves da dengue atingem, pelo menos, 500 mil pessoas, apresentando taxa de mortalidade de até 10% para pacientes hospitalizados e de 30% para pacientes não tratados (Holmes *et al.*, 1998).

A dengue clássica se inicia abruptamente com febre alta (39°C) de no máximo sete dias de duração e, no mínimo, mais dois sintomas entre cefaléia, dor retro orbitária, mialgia, artralgia, exantema, dor abdominal, prostração e fenômenos hemorrágicos leves. Já nas formas mais graves, a Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) e Síndrome do Choque do Dengue (SCD) (Halstead, 2004), os sintomas iniciais são semelhantes aos da dengue clássica, porém, após o terceiro dia o quadro se agrava com manifestações hemorrágicas, trombocitopenia,

derrames cavitários, instabilidade hemodinâmica, debilidade profunda, agitação ou letargia, palidez, cianose e diminuição brusca de temperatura (Ministério da Saúde – FUNASA 2002; Toletto *et al.*, 2006).

A transmissão ocorre através da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo incriminadas várias espécies do subgênero *Stegomyia*. O principal vetor desta arbovirose é o mosquito de hábitos urbanos *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762). Já o *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) é um vetor de importância secundária na Ásia, onde predomina em áreas rurais, que ainda não foi incriminado como vetor do agente etiológico da doença nas Américas, embora já tenham sido encontrados espécimes naturalmente infectados (Ibañez-Bernal *et al.*, 1997; Braga & Valle, 2007).

No Brasil, o *Aedes albopictus* teve seu primeiro registro em 1986 no Estado do Rio de Janeiro (Forattini, 1986) e, atualmente, se encontra amplamente distribuído no país, especialmente nas regiões Sul e Sudeste (Santos, 2003).

Associado a ecossistemas antrópicos, o *Aedes aegypti* é um mosquito antropolítico, com atividade hematofágica diurna e com boa capacidade de adaptação ambiental (Ribeiro *et al.*, 2008). Presente em áreas urbanas, é geralmente encontrado entre as latitudes 35°N e 35°S e pode habitar locais de até 2.200 metros de altitude (OPAS, 1995; Donalísio & Glasser, 2002; Singhi *et al.*, 2007), sendo encontrado principalmente colonizando depósitos de armazenamento de água e pequenas coleções temporárias (Teixeira *et al.*, 1999; Braga & Valle, 2007).

A incidência de casos de dengue varia conforme as condições climáticas, e está associada a fatores ambientais, como aumento de temperatura, pluviosidade e umidade do ar, condições que favorecem o aumento do número de criadouros disponíveis para o desenvolvimento do vetor (Ribeiro *et al.*, 2006).

A fêmea do culicídeo é infectada com o vírus ao se alimentar do sangue de um indivíduo infectado, durante a fase virêmica. Após um período de incubação extrínseca, que dura de oito a dez dias, o mosquito está apto a transmitir o vírus por toda sua vida (Donalísio & Glasser, 2002), seja para o homem, através da picada e injeção de saliva, ou para outros mosquitos, através da cópula ou verticalmente (Singhi *et al.*, 2007). Depois da picada pelo mosquito infectado, o período de incubação do vírus no homem dura, em média, de quatro a sete dias,

durante os quais a doença pode variar de formas assintomática e clinicamente inespecíficas até quadros fatais (Ferreira *et al.*, 2005; Singhi *et al.*, 2007).

Epidemiologicamente, a forma assintomática apresenta grande importância, pois constitui fonte silenciosa de transmissão do vírus para áreas indenes, mas infestadas com o vetor (Vasconcelos *et al.*, 1998). Desta forma, a ampla circulação viral é um fator de risco para o surgimento de formas mais graves do dengue (Guzmán & Kourí, 2002).

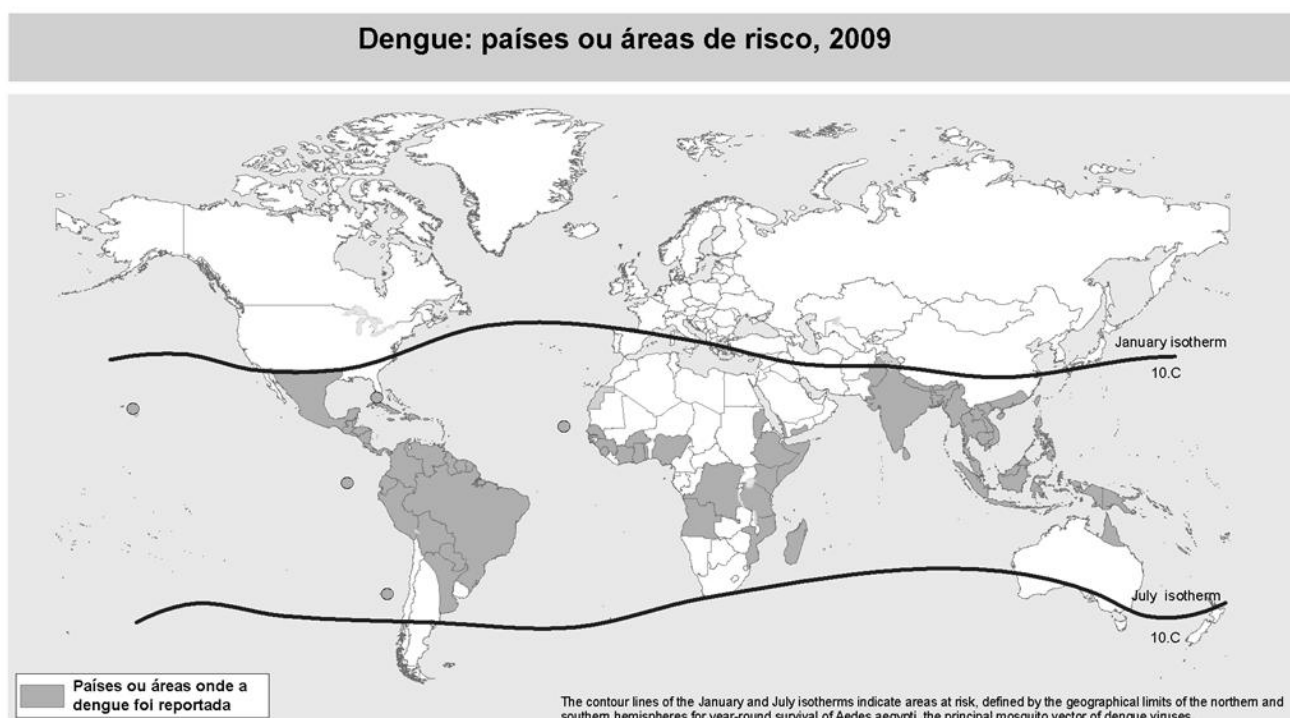


Figura 1 - Países/Áreas com risco de transmissão de dengue no ano de 2008, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (Fonte: WHO 2009).

1.2 Dengue no Brasil e no Paraná

Da África, o *Aedes aegypti* se dispersou por todo o hemisfério ocidental no século XVII (Teixeira *et al.*, 1999). Na década de 1950, através de uma campanha nacional com estruturação militar, o Brasil conseguiu erradicar esse vetor. O país enfrentou várias reinfestações que, detectadas precocemente, foram eliminadas. Em 1976, uma nova infestação não foi controlada, atingindo aproximadamente

3.794 municípios em todas as 27 Unidades de Federação (Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994; Teixeira & Barreto, 1996; Tauil 2002; Pimenta Jr., 2005; Câmara *et al.*, 2007).

A introdução sequencial de diferentes sorotipos do vírus contribui para pressionar a incidência da doença (Câmara *et al.*, 2007). Em 1981, uma epidemia com os sorotipos DEN-1 e DEN-4 ocorreu em Boa Vista, Roraima (Osanai *et al.*, 1983). O uso de inseticidas nos programas de saúde pública desde 1967 não impediu o aparecimento de várias epidemias desde 1986, quando o número de casos aumentou em diversas regiões brasileiras (Lima *et al.*, 2003).

A dengue apresenta um padrão sazonal com maior incidência no primeiro semestre do ano, período mais quente e úmido, típico dos climas tropicais (Braga & Valle, 2007). Em aproximadamente duas décadas, o número de casos no país aumentou de 46.000 em 1986 para 790.000 em 2002, sendo considerada endêmica no país (Martins *et al.*, 2008). Em 2008, o Brasil contava com aproximadamente 80% dos mais de 908 mil casos notificados de dengue nas Américas (PAHO, 2009).

Situando-se entre os paralelos 22° e 27° S e os meridianos 48° e 50° W, o Estado do Paraná possui 199.575 km² divididos entre planície litorânea e três planaltos (Figura 2). Ocorrem três tipos climáticos no Estado: Clima Subtropical com verão quente (Cfa), Clima temperado com verão ameno (Cfb) e Clima Tropical Superúmido (Af) (Figura 3). A população humana foi estimada em 9.536.458, dos quais mais de 81% residem em áreas urbanas (Figura 4) (Silva *et al.*, 2008).

A primeira notificação de casos autóctones de dengue no Estado do Paraná data de 1993. Desde então, importantes epidemias foram registradas nos anos de 1996, 2002, 2003 e 2007, sendo nesta última confirmados 25.988 casos da doença (Mendonça *et al.*, 2004; SESA-PR, 2010).

A Secretaria de Vigilância em Saúde notificou 155.771 casos de dengue no país nas sete primeiras semanas epidemiológicas de 2010. Apenas 2% dos casos foram registrados para a região Sul, cuja concentração (96,4%) ocorreu no Paraná (SVS, 2010).

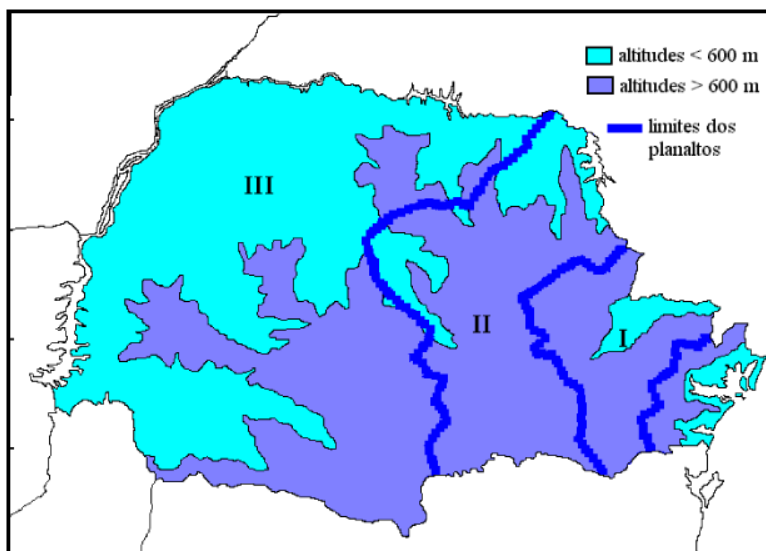


Figura 2 - Distribuição dos três planaltos paranaenses (Fonte: Miretzki, 2003).

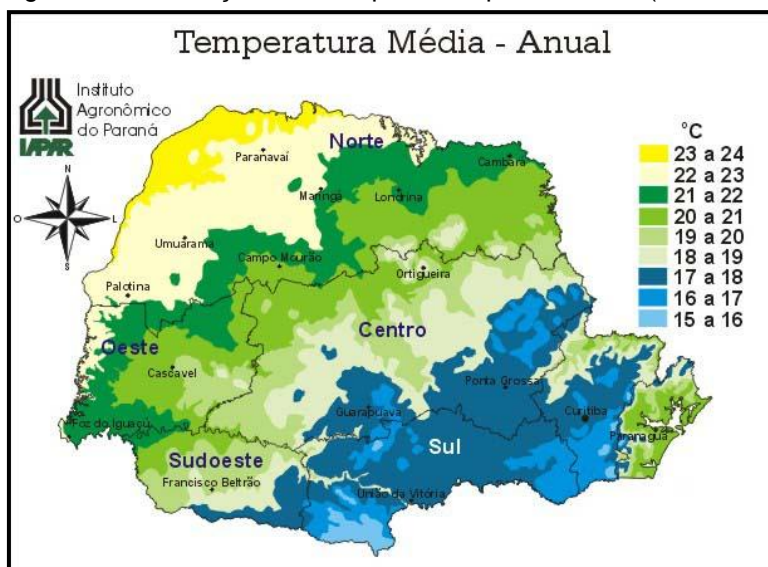


Figura 3 - Temperaturas médias anuais registradas para o Estado do Paraná (Fonte: IAPAR).

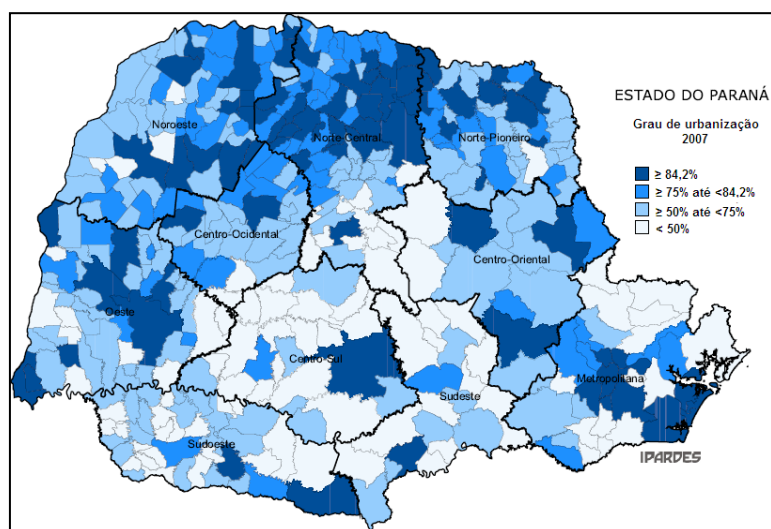


Figura 4 - Grau de urbanização do Estado do Paraná no ano de 2007 (Fonte: IPARDES 2008)

Segundo Boletins Informativos da Dengue, realizados pela Secretaria de Vigilância em Saúde, foram registrados no Estado, no período de janeiro a abril de 2009, 6.233 casos suspeitos, dos quais 396 foram confirmados, sendo 344 autóctones. No mesmo período de 2010, foram registrados 39.981 casos suspeitos, sendo 10.010 confirmados, dos quais 9.571 eram autóctones. Esses valores representam um aumento de 641,4% dos casos suspeitos e 2.782,3% dos casos confirmados autóctones no ano de 2010, quando comparado a 2009. De acordo com os órgãos públicos de vigilância epidemiológica, este aumento é consequência de fatores determinantes, como o elevado índice de infestação predial (IIP), observado em vários municípios no início deste ano, e dificuldade no controle do vetor e participação da população para eliminação de criadouros, tornando o risco iminente e permanente (Boletim Informativo dengue nº 4/2009 e 4/2010).

1.3 Inseticidas e mecanismos de ação

Como não existe vacina, o combate a dengue se baseia no controle do inseto vetor. Embora ocorram importantes avanços no desenvolvimento de medidas alternativas, o uso de inseticidas químicos continua sendo essencial nos programas de controle integrado, sendo utilizados há muitos anos devido a sua eficácia, sustentabilidade e baixo custo (Rose, 2001; Prieto *et al.*, 2002).

No Brasil, os programas focalizados nas formas imaturas estão fundamentados no manejo associado ao uso de produtos biológicos, como o *Bacillus thuringiensis* Berliner, e químicos, como temephos (Beserra *et al.*, 2007).

Os inseticidas organofosforados (OP) são a classe de maior interesse comercial e toxicológico. Possuem esse nome por serem ésteres ou tióis derivados de ácidos fosfóricos, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico (Santos *et al.*, 2007). A aplicação comercial destes compostos na agricultura começou em 1941, com o Scharadan (octametilpirofosforamida) (Gilman *et al.*, 2003). São amplamente utilizados em água estagnada e reservatórios de água potável para uso doméstico por serem biodegradáveis, porém, devido à instabilidade química,

requerem aplicações periódicas, em ciclos bimestrais (Braga & Valle, 2007; Melo *et al.*, 2008).

Esta classe de inseticidas age por contato e ingestão, ligando-se ao centro esterásico da enzima acetilcolinesterase (AChE), impossibilitando-a de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético. A presença continuada da acetilcolina nas terminações nervosas interfere no mecanismo de transmissão neuronal. Deste modo, na presença do organofosforado, o estímulo do sistema nervoso central é contínuo, ocasionando paralisia e morte do inseto (Braga & Valle, 2007).

O organofosforado temefos ($C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$) (Figura 5) foi introduzido no mercado em 1965 (Melo *et al.*, 2008), sendo o único larvicida do grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquito aprovado pela Organização Mundial da Saúde para uso em água de consumo humano, por suas características de baixa toxicidade aguda e pouca persistência no ambiente (WHO, 2007). Esse produto pode causar intoxicações graves se absorvido pelos pulmões ou ingerido em altas doses, sendo ainda discretamente irritante em contato com a pele e olhos (FISPQ, 2010).

No Brasil, este composto é utilizado desde 1967 (Ministério da Saúde 1968), sendo aplicado em ciclos bimestrais. Após a epidemia de 1986 o uso de organofosforados se intensificou (Schatzmayer, 1986; Dletz, 1990; Braga *et al.*, 2004), e desde a implantação do Plano para Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa), seu uso em programas de saúde pública foi ampliado consideravelmente pela adição de cerca de 5 mil toneladas de temefos por ano (SESA-PE, 1997; FUNASA, 2001).

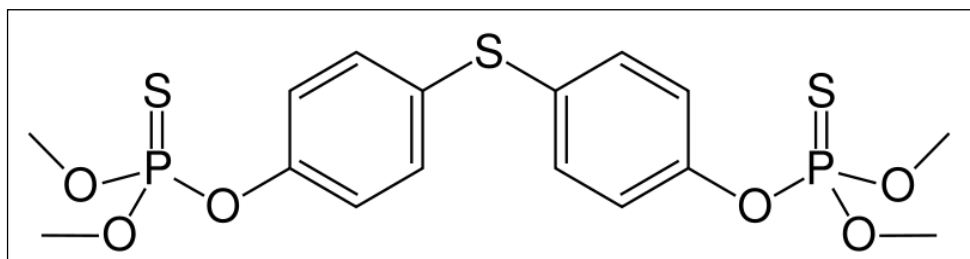


Figura 5 - Estrutura química do larvicida organofosforado temefós, de nome químico O,O-(ditio-4,1fenileno) bis (O,O-dimetilfosforotioato); O,O'(ditio-4,4-fenileno)O,O,O',O',tetrametil bis fosfotioato.

Outra classe de inseticida amplamente utilizado no país são os piretróides. Estes compostos foram introduzidos no mercado em 1976 e ainda que sejam mais caros por unidade de peso em relação aos outros praguicidas, os piretróides têm sido bastante empregados na área da Saúde e na Agricultura. Isto ocorre devido à sua alta eficiência, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo, resultando em menor contaminação nas aplicações (SUCEN, 2010).

De custo elevado, são produzidos a partir de uma substância natural extraída de crisântemos, o piretro. Os piretróides sintéticos classe dois (cipermetrina) e três (deltametrina) (Figura 6) somam aproximadamente 25% do mercado mundial de inseticidas, pois agem rapidamente, são biodegradáveis, não cumulativos e raramente tóxicos a aves e mamíferos (Hemingway, 2004; Braga & Valle, 2007).

A exposição aos piretróides pela população ocorre principalmente via ingestão de resíduos presentes nos alimentos e inalação após o uso do inseticida no interior de domicílios. Apesar das vantagens apresentadas pelos piretróides em relação a outros inseticidas, os mesmos cuidados devem ser tomados para sua utilização, já que podem exercer nos vertebrados efeitos neuro e cardiotoxicos, afetando principalmente o fígado e os rins (Santos *et al.*, 2007c).

Os piretróides, bem como o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) atuam no sistema nervoso do inseto, alterando a função normal do canal de sódio. Piretróides do tipo I provocam a abertura prolongada do canal, levando a impulsos repetitivos em resposta a um único estímulo, levando à exaustão e morte. Piretróides do tipo II causam uma despolarização da membrana, acompanhada por uma supressão do potencial de ação (Soderlund & Bloomquist, 1989; Narahashi, 1992; Dong, 2007).

Em 1999, os piretróides substituíram os organofosforados no controle de adultos de *Aedes aegypti* na maior parte do país, com exceção de São Paulo, onde são utilizados desde 1989 (Macoris *et al.*, 1999; Braga *et al.*, 2004). A periodicidade das aplicações ocorre de seis meses, porém, a duração do efeito residual destes inseticidas pode variar entre dois e seis meses (Santos *et al.*, 2007b).

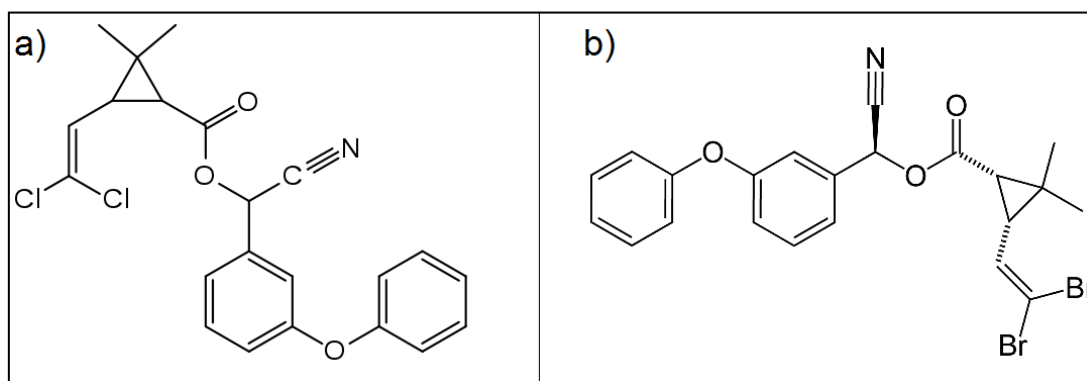


Figura 6 - Estruturas químicas da a) Cipermetrina ($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$) e b) Delametrina ($C_{22}H_{19}Br_2NO_3$).

1.4 Mecanismos de resistência

A resistência é definida como a habilidade de uma linhagem de um organismo em tolerar doses de tóxicos que seriam letais para a maioria da população normal (suscetível) da mesma espécie (Poletti & Omoto, 2003). Ela pode ser vista como um processo de evolução acelerada, em que uma população resistente é selecionada com o uso de determinados pesticidas (Braga & Valle, 2007).

O uso do inseticida não causa alterações genéticas nos indivíduos, apenas seleciona os que já possuem a característica necessária para sua sobrevivência. Há quatro mecanismos distintos que promovem resistência aos inseticidas: penetração reduzida, alterações comportamentais, resistência metabólica e alterações estruturais nos sítios-alvo (Hemingway & Ranson, 2000; Brengues *et al.*, 2003; Paiva 2006).

A redução na taxa de penetração do inseticida é um mecanismo no qual mudanças na composição protéica do integumento podem levar a uma diminuição da penetração do inseticida. É considerado de importância secundária por conferir um baixo nível de resistência, porém associado a outros mecanismos o nível de resistência aumenta consideravelmente (Apperson & Georgiou, 1975; Braga & Valle, 2007).

As alterações comportamentais podem fazer com que os insetos reconheçam superfícies tratadas com inseticidas, apresentando maior tendência

de não adentrar nas áreas sob tratamento, assim, reduzindo a taxa de invasão de domicílios ou modificando o horário do repasto sanguíneo (Mathenge *et al.*, 2001; Paiva, 2006) Este mecanismo ainda não está claro, podendo ser um modo de seleção natural.

A resistência metabólica se dá devido ao aumento da atividade detoxificante de enzimas, o que possibilita a degradação da molécula química em compostos inertes. Exemplos de grupos enzimáticos envolvidos neste mecanismo em espécies de artrópodes são as monooxigenases dependentes do citocromo P-450, esterases e GSH-transferases (Poletti & Omoto, 2003).

As alterações estruturais no sítio-alvo diminuem sua afinidade pelo inseticida e são causadas por alterações nos genes que codificam o sítio de ação do inseticida, impedindo ou dificultando a ligação do composto com a molécula-alvo. Este tipo de alteração que pode comprometer parcial ou integralmente a atividade do inseticida está presente na enzima acetilcolinesterase (AChE), nos receptores neuronais do ácido gama-aminobutírico (GABA) e nos canais de sódio voltagem dependente (Na_v) (Hemingway *et al.*, 2004).

1.5 Kdr – Knockdown Resistance

“*Knockdown resistance*” ou “*kdr*” é, provavelmente, o mais importante mecanismo de resistência relatado em vários insetos, e ocorre devido a uma redução de 10 a 20 vezes na sensibilidade dos sítios-alvo a piretróides (Davies *et al.*, 2008). O termo “*kdr*” é aplicado a insetos que perdem sua coordenação imediatamente após a exposição ao inseticida, recuperando-se após o efeito do mesmo (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007; García *et al.*, 2009).

O canal de sódio voltagem-dependente (Na_v) é uma proteína transmembrana constituída por quatro domínios homólogos (I-IV), cada qual com seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6) (Figura 7) (Loughney *et al.*, 1989; Martins *et al.*, 2009a). O funcionamento correto destes canais é essencial para a transmissão normal do impulso nervoso e, quando em contato com o inseticida, ocasiona a morte do inseto (García *et al.*, 2009).

Pesquisas sobre alterações no gene do canal de sódio associadas ao Kdr identificaram inúmeras mutações em diversas espécies de insetos (Soderlund & Knipple, 2003), como *Anopheles gambiae* (Martinez-Torres *et al.*, 1997), *Blattella germanica* (Liu *et al.*, 2000) e *Drosophila melanogaster* (Williamson *et al.*, 1996). A mutação mais comum associada à resistência a piretróides é a substituição de uma leucina por uma fenilalanina no segmento 6 do domínio II do canal de sódio (Williamson *et al.*, 1996; Martinez-Torres *et al.*, 1997).

Para *Aedes aegypti*, Brengues *et al.* (2003) identificaram várias mutações no S6 do domínio II em mosquitos resistentes, dentre as quais a clássica Leu-Phe não estava presente.

Analisando mutações não sinônimas nos éxons 20 e 21 de populações de *Aedes aegypti* da América Latina, Saavedra-Rodriguez *et al.* (2007) descreveram duas novas mutações nos códons 1011 e 1016. Uma transição A/G (adenina/guanina) no alelo 1011 leva a uma alteração de uma Isoleucina para uma Metionina (Ile1011Met), enquanto que uma transição A/G no alelo 1016 leva a uma alteração de uma Valina por uma isoleucina (Val1016Ile).

Os genes que conferem o *kdr* são recessivos, ou seja, só são expressos em homozigose (Davies *et al.*, 2008). Deste modo, através de bioensaios moleculares, Martins *et al.* (2009b) perceberam que a frequência do alelo 1016 mutante em homozigose (Ile/Ile) era maior nos casos de indivíduos resistentes. Esses dados corroboram a associação desta mutação com a resistência de populações brasileiras de *Aedes aegypti* a piretróides.

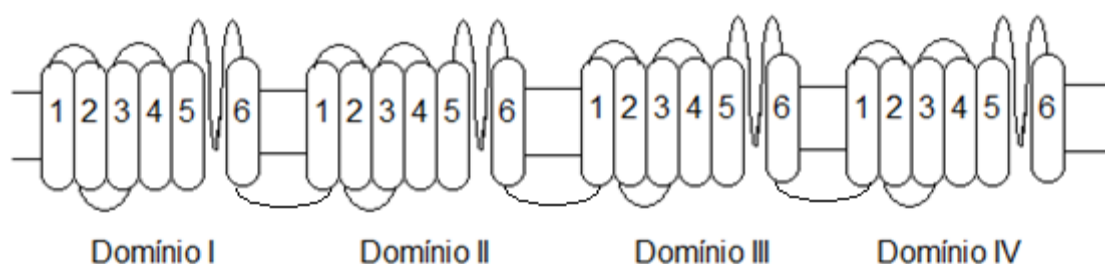


Figura 7 - Esquema do canal de sódio voltagem dependente, seus quatro domínios homólogos e suas seis subunidades hidrofóbicas.

2. JUSTIFICATIVA

O uso continuado de inseticidas químicos, que data de mais de 40 anos para organofosforados e aproximadamente 10 anos para piretróides, tem levado as populações a uma intensa pressão de seleção, podendo selecionar indivíduos capazes de tolerar doses que normalmente causariam mortalidade a indivíduos suscetíveis (Lima *et al.*, 2003). A seleção dessas populações pode inviabilizar os programas de controle de vetores, favorecendo a transmissão da dengue (Macoris *et al.*, 1999; Campos & Andrade, 2001; Karunaratne & Hemingway, 2001; Carvalho *et al.*, 2004).

O Estado do Paraná é responsável por mais de 95% dos casos de dengue registrados para a região Sul do Brasil na última década, apresentando municípios, como Maringá, Londrina e Foz do Iguaçu, onde a ocorrência dos casos é recorrente ao longo dos anos, apesar dos esforços das Secretarias de Saúde e Centro de Controle de Zoonoses.

Deste modo, a fim de conferir segurança à população e economia aos cofres públicos (Campos & Andrade, 2001), a eficiência dos produtos utilizados no controle de insetos vetores deve ser frequentemente monitorada. Bioensaios para avaliação da suscetibilidade larval visam detectar prontamente a presença de indivíduos resistentes em uma população de insetos para permitir a otimização das campanhas de saúde através do manejo de produtos e utilização de métodos alternativos de controle (Bisset *et al.*, 2005). Do mesmo modo, a detecção de mutações associadas à resistência é fundamental para auxiliar nas estratégias de manejo destinadas a prolongar o tempo de uso de um inseticida (Soderlund & Knipple, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti* ao larvicida organofosforado temephos pestanal e detectar e verificar a frequência da mutação Val1016Ile no gene do canal de sódio de populações de *Aedes aegypti* provenientes de diferentes municípios do Estado do Paraná – Brasil.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar a suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* de terceiro instar final e quarto inicial ao larvicida temephos pestanal, estimando as CL_{50} e CL_{95} , RR_{50} e RR_{95} .

Confirmar a coexistência entre espécies, porcentagens de eclosão e razão sexual de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em municípios do Estado do Paraná – Brasil.

Verificar a distribuição da mutação Val1016Ile no gene do canal de sódio de populações de *Aedes aegypti* de diferentes municípios do Estado do Paraná;

Verificar a distribuição da mutação Val1016Ile no gene do canal de sódio de *Aedes aegypti* de diferentes regiões administrativas de Foz do Iguaçu, de acordo com seus limites geográficos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Foram analisadas populações de mosquitos provenientes de 12 municípios do Estado do Paraná, de acordo com as coletas realizadas pela Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (Figura 8).

4.2 Caracterização dos municípios analisados

Os doze municípios estudados foram caracterizados de acordo com dados retirados do boletim informativo dengue n.º 4/2010, até a data de 30/04/2010, conforme informações dos municípios e respectivas regionais de saúde (Tabela I).

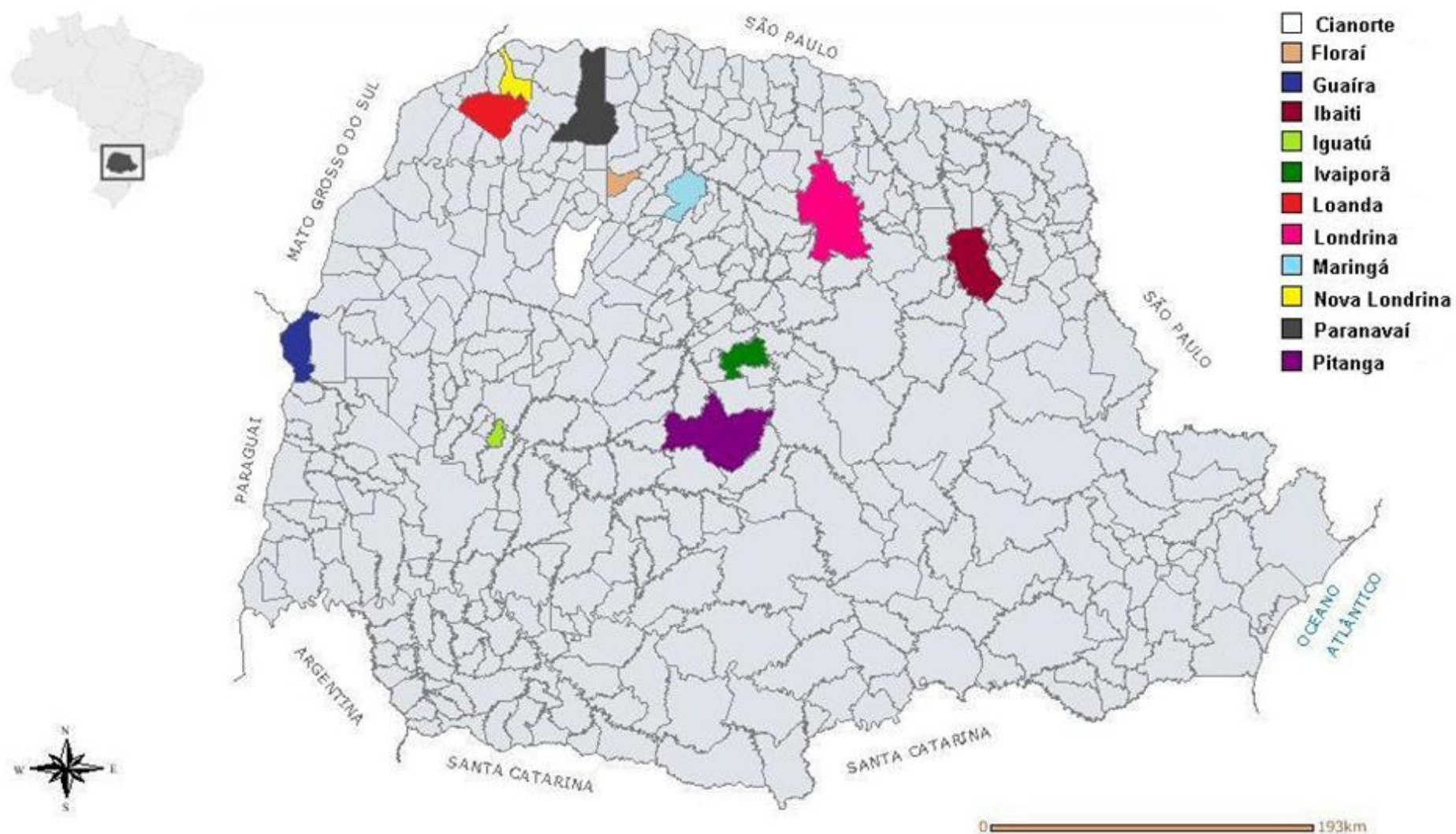


Figura 8 - Mapa do Brasil, com destaque para o Estado do Paraná e os doze municípios analisados para ocorrência de populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

Tabela I – Caracterização dos municípios, suas respectivas regionais de saúde, população, número de casos confirmados, notificados e incidência.

Município	Relevo	População	Casos confirmados			Casos Notificados	Incidência*
			Autóctones	Importados	Total		
Maringá	Terceiro Planalto	329.800	1092	16	1108	5149	331,11
Paranavaí	Terceiro Planalto	79.747	92	1	93	435	115,36
Londrina	Terceiro Planalto	503.041	579	32	611	4421	115,10
Cianorte	Terceiro Planalto	63.832	55	7	62	284	86,16
Loanda	Terceiro Planalto	21.073	9	0	9	59	42,71
Guaíra	Terceiro Planalto	27.517	5	2	7	44	18,17
Ibaiti	Segundo Planalto	26.806	0	2	2	5	-
Iguatu	Terceiro Planalto	1.609	0	0	0	5	-
Floraí	Terceiro Planalto	5.103	0	0	0	4	-
Nova Londrina	Terceiro Planalto	13.438	0	1	1	4	-
Ivaiporã	Terceiro Planalto	28.120	0	1	1	3	-
Pitanga	Terceiro Planalto	34.160	0	0	0	0	-

* Incidência: casos autóctones por 100.000 habitantes

4.3 Estabelecimento e manutenção das colônias de insetos

Ovos de *Aedes* spp. foram coletados pelos respectivos Núcleos de Entomologia da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA), nos períodos de agosto de 2008 a setembro de 2009 (Tabela II). Ovitampas, recipientes escuros contendo paletas de eucatêx de 2 cm de largura por 12 cm de comprimento, presas em suporte plástico e submersas em 500 ml de solução de feno a 10% (Reiter *et al.*, 1991), ficaram em campo durante cinco dias. A distribuição das armadilhas ocorreu de forma aleatória nos peridomicílios das residências em vários pontos dos municípios, seguindo o padrão da Fundação Nacional de Saúde.

Após a coleta, as paletas foram encaminhadas ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná (Departamento de Zoologia), onde ficaram armazenadas em condições iguais de temperatura ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($80\pm 10\%$) e foto-período (12h:12h). As paletas tiveram seus ovos quantificados sob microscópio estereoscópico e posteriormente, para induzir a eclosão, foram colocadas individualmente em copos plásticos com capacidade para 770 ml, contendo água desclorada suficiente para cobrir a paleta e aproximadamente 0,36 g/copo de ração de gatos Purina® Cat Chow ® (Figura 9). Após a eclosão, as paletas foram retiradas e as larvas transferidas para um novo recipiente plástico onde receberam uma quantidade aproximada de 1g de ração por dia, até atingirem o estágio de pupa. Nesta fase, os indivíduos foram transferidos para um novo recipiente e colocados em gaiolas para identificação dos adultos quanto ao sexo e espécie, e então mantidos para a obtenção de novas gerações (Figura 10). O mesmo processo foi realizado na criação de uma colônia Rockefeller (cepa suscetível), cujos ovos se encontravam disponíveis no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária.

Tabela II – Municípios avaliados e seus respectivos núcleos regionais, meses relacionados aos períodos de instalação e posição em relação aos planaltos paranaenses.

Município	Núcleo Regional	Regional de Saúde	Período de instalação
Iguatu	Toledo	10	07/2008
Guaíra	Guaira	20	10/2008
Loanda	Porto Rico	14	10/2008
Nova Londrina	Porto Rico	14	11/2008
Ivaiporã	Apucarana	22	12/2008
Pitanga	Apucarana	22	12/2008
Maringá	Maringá	15	12/2008
Paranavaí	Porto Rico	14	02/2009
Cianorte	Apucarana	13	02/2009
Londrina	Maringá	17	03/2009
Ibaiti	Jacarezinho	19	03/2009
Floraí	Apucarana	15	09/2009

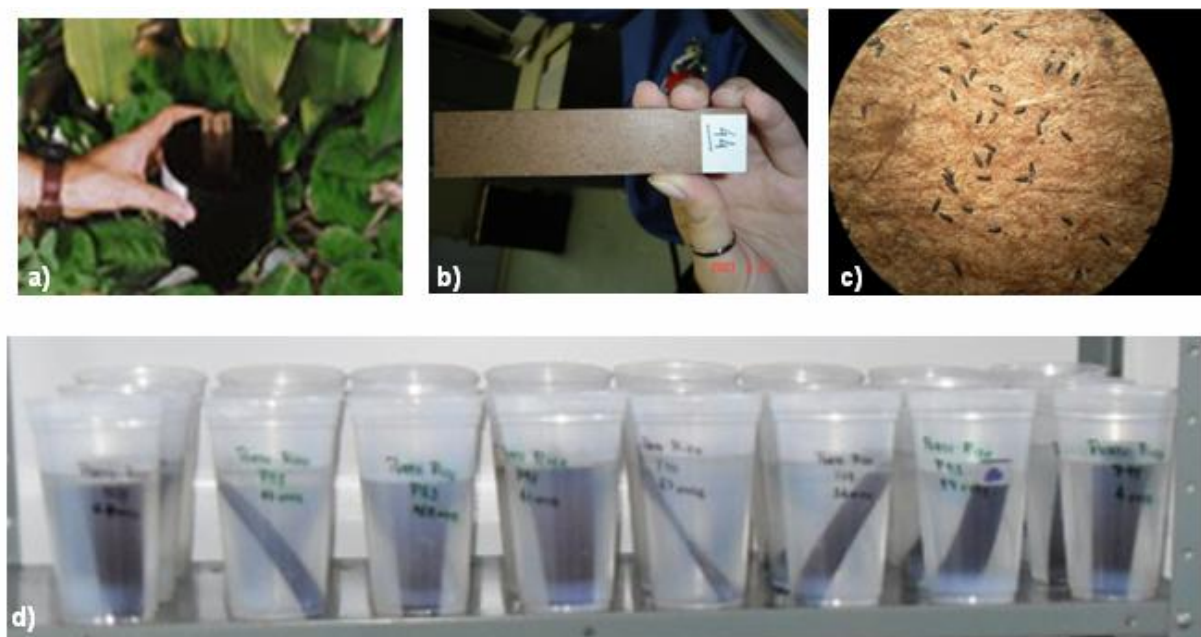


Figura 9 - Armadilha de oviposição e início do processo de criação: a) ovitrampa, b) paleta, c) detalhe da paleta com ovos, d) recipientes com paletas, água desclorada e ração para estimular a eclosão dos ovos.

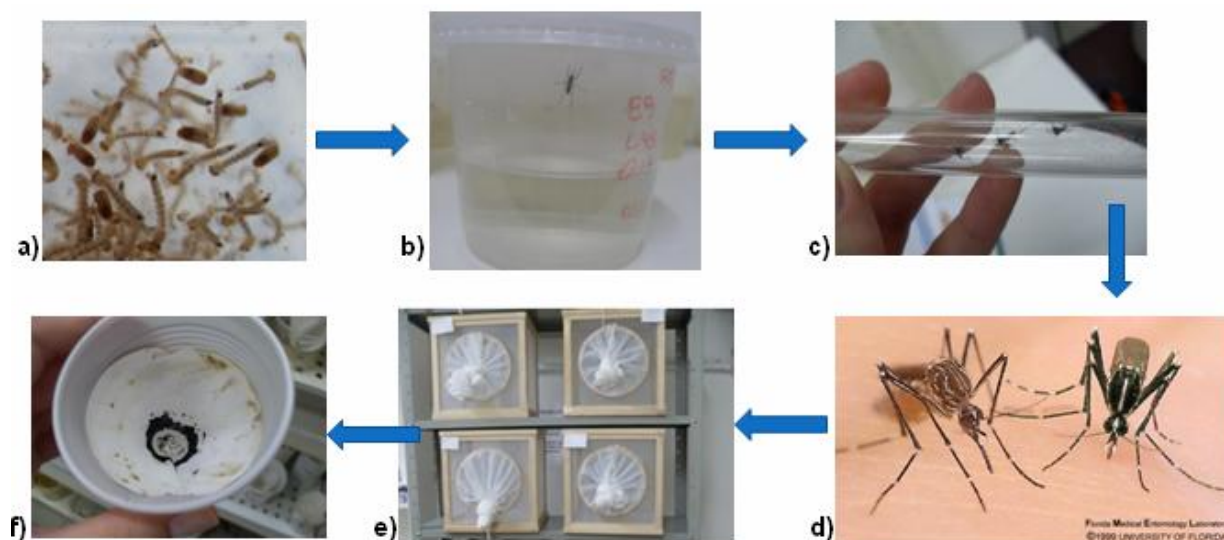


Figura 10 - Processo de criação para obtenção de larvas para realização dos bioensaios: a) larvas e pupas, b) recipiente com pupas e adultos, c) identificação de adultos, d) diferenças morfológicas entre *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Florida Medical Entomology Laboratory, 1999), e) gaiolas para criação de adultos, f) oviposição.

4.4 Bioensaio para verificar a suscetibilidade de mosquitos ao temephos

O inseticida utilizado foi o Temephos Pestanal (Sigma) grau técnico, e a calibração do produto químico foi realizada com a colônia padrão de *Aedes aegypti* (Rockefeller). Nesta colônia suscetível, foram testadas onze concentrações do inseticida (Figura 11) e, a partir da análise estatística dos resultados, encontramos a concentração que mata 99% dos indivíduos testados (CL_{99rock}) de 0,008 ppm.

Todos os bioensaios seguiram o modelo recomendado pela Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas (MoReNAa) (Braga & Valle 2007). Para detectar qualitativamente a presença de indivíduos resistentes em relação à colônia Rockefeller, foi utilizada uma dose diagnóstica (DD) de 0,016ppm correspondendo a duas vezes a CL_{99} (0,008 ppm) da colônia suscetível (WHO 1981, 1992; Lima *et al.* 2003). Os bioensaios foram repetidos quatro vezes, em diferentes dias.

Simultaneamente, foi realizado o bioensaio Dose Resposta (DR). Neste ensaio quantitativo conta com quatro réplicas por concentração; foram utilizadas 10 concentrações (0,0042; 0,0072; 0,0102; 0,0132; 0,0162; 0,0192; 0,0222; 0,0252; 0,0282 e 0,0312 ppm), entre elas a DD (0,0162 ppm), além de um controle contendo apenas água e o volume de álcool absoluto equivalente ao maior volume utilizado de inseticida. Cada réplica recebeu 20 larvas de terceiro instar final e quarto inicial, resultando em 80 larvas por concentração, completando um volume de 100 mL. Os testes foram repetidos quatro vezes em diferentes dias e o desenho experimental seguiu as orientações da OMS. Todos os testes foram realizados em paralelo com a colônia Rockefeller, utilizada como parâmetro para o controle de qualidade (Figura 12).

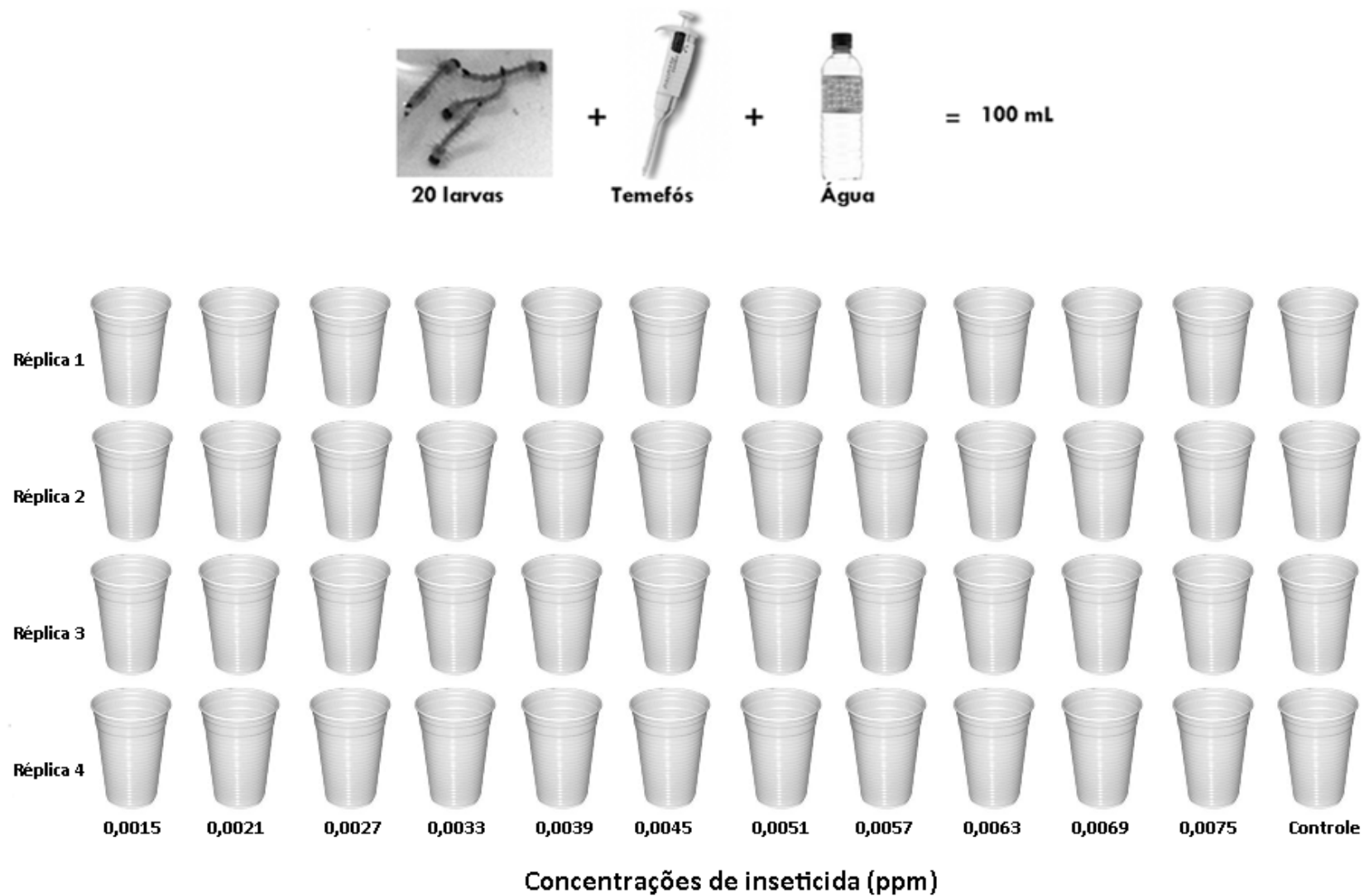


Figura 11 - Esquema do ensaio para calibração da colônia suscetível Rockefeller de *Aedes aegypti*.

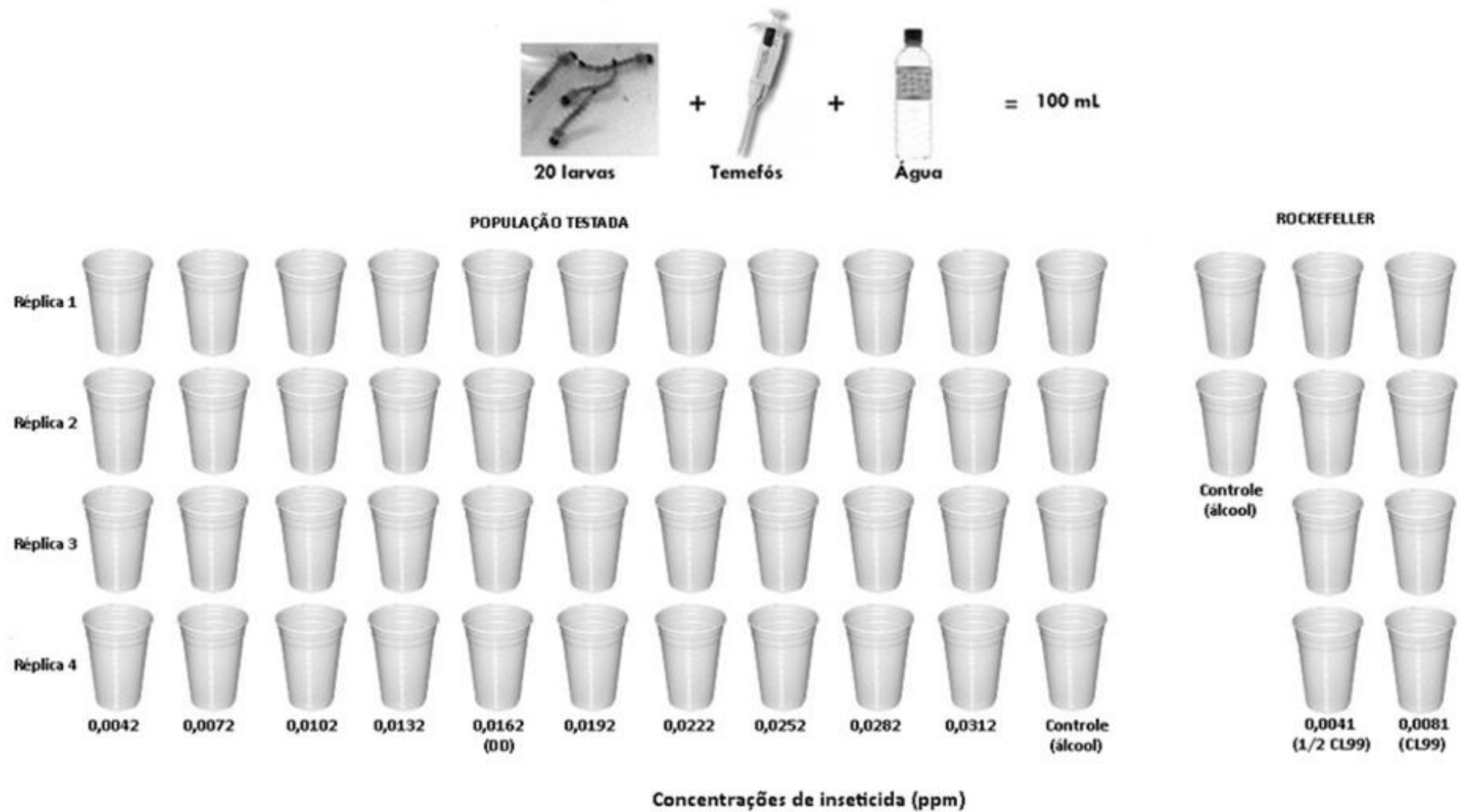


Figura 12 – Esquema do ensaio dose resposta para as populações de campo de *Aedes aegypti*.

4.5 Análise estatística

Para detecção de alterações da suscetibilidade das populações avaliadas, foi seguido o critério proposto por Davidson & Zahar (1973) (Tabela III).

Tabela III – Critério para avaliação da suscetibilidade a partir da mortalidade observada com a Dose Diagnóstica.

% Mortalidade	Status
>98%	Suscetível
< 98% e >80%	Alteração na suscetibilidade
<80%	Resistente

A razão de resistência (RR) como indicador quantitativo foi calculada comparando as concentrações letais 50 e 95% de mortalidade (CL₅₀ e CL₉₅) das localidades com a colônia Rockefeller. Razões de resistência menores que cinco indicam baixa resistência; entre cinco e 10 indicam média resistência e acima de 10, alta resistência (Mazzari & Georghiou 1995). Para determinar as concentrações letais CL₅₀ e CL₉₅, testes de χ^2 e cálculos de intervalos de confiança, foi utilizado o programa Probit GW-bacis (Finney 1971). O critério do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária estipula como aceitos os bioensaios com χ^2 menor que 10, indicando que os resultados possuem um alto grau de confiabilidade.

4.6 Amostras para extração de DNA

Para as análises moleculares, foram utilizados espécimes de *Aedes aegypti* provenientes de diferentes municípios do Estado do Paraná.

As reações para os municípios de Floraí, Loanda, Londrina e Paranavaí (Figura 13) foram realizadas a partir de extrações já disponíveis em laboratório, sendo assim o número de espécimes variou conforme sua disponibilidade (TABELA IV).

Devido à proximidade com a Argentina e Paraguai, cujas ações de controle de vetores não são bem conhecidas, o município de Foz do Iguaçu teve seus 11 estratos agrupados de modo a gerar cinco regiões: Norte (1, 2, 3), Sul (11), Leste (5, 9), Oeste (6, 10), Centro (4, 7, 8) (Figura 14). Foram utilizados 50 espécimes de *Aedes aegypti* de cada região (TABELA V), provenientes de coletas realizadas pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) em 2009. Devido à falta de material, foram utilizadas extrações da região Sul já disponíveis no laboratório, referentes à coletas anteriores.

Para impedir a contaminação das fêmeas com esperma dos machos, os indivíduos foram mortos logo após a eclosão e, então, separados em microtubos de 1,5 mL contendo álcool absoluto para posterior extração de DNA.

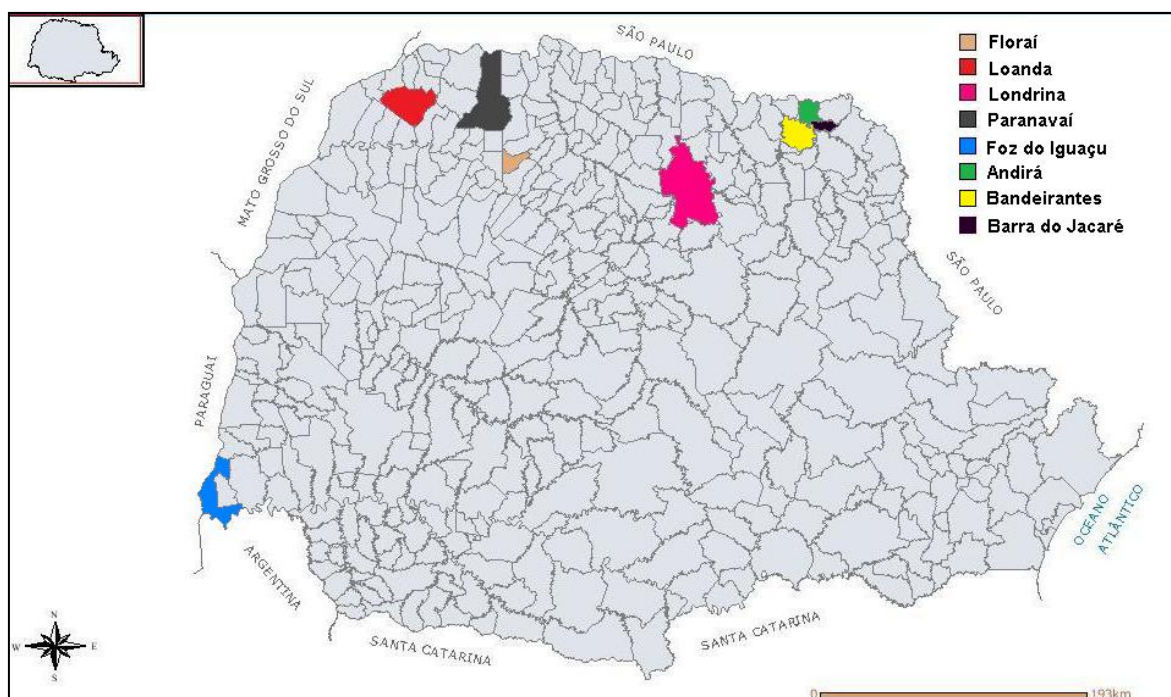


Figura 13 – Mapa do Paraná, com destaque para os cinco municípios avaliados para a presença da mutação no códon 1016.

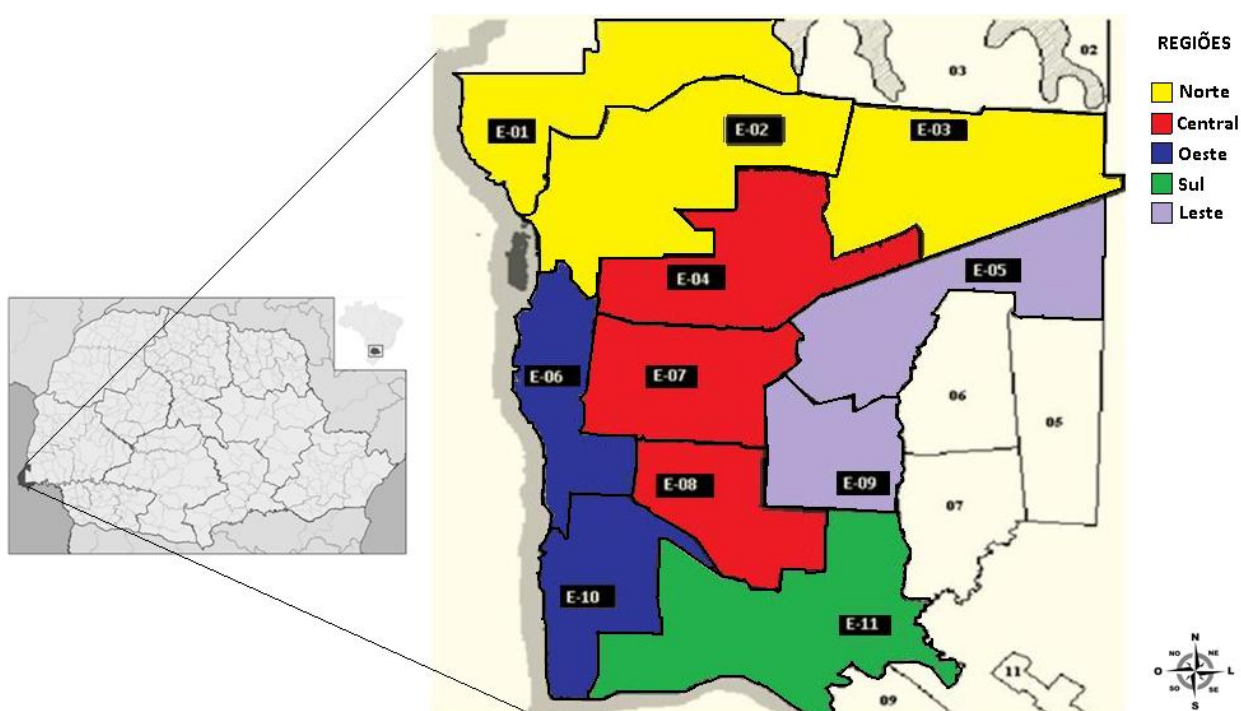


Figura 14 - Mapa do Brasil, com destaque para o Estado do Paraná e o Município de Foz do Iguaçu, cujos estratos foram agrupados em cinco regiões.

Tabela IV- Relação das extrações de DNA utilizadas para realização de PCR, referentes a diferentes municípios do estado do Paraná.

Município	Espécimes
Loanda	20
Londrina	50
Paranavaí	40
Floraí	30
Bandeirantes	30
Barra do Jacaré	23
Andirá	08

Tabela V - Relação de mosquitos separados para extração de DNA, referentes às regiões de Foz do Iguaçu.

Região	Espécimes	Sexo	Estrato
Leste	13	♀	5
	15	♀	9
	22	♂	5
Norte	21	♀	2
	19	♂	2
Central	20	♀	4
	2	♀	7
	28	♂	4
Oeste	27	♀	10
	1	♀	6
	16	♂	10
	6	♂	6
Sul	20	?*	11
	24	♀	11
	6	♂	11

*Como foram utilizados 20 extrações de DNA já disponíveis no laboratório, referentes à coleta II, não foi possível separar os indivíduos por sexo.

4.7 Método para extração de DNA

Para a extração de DNA foi seguido protocolo de Cheung *et al.* (1993) ligeiramente modificado (Anexo 1). Os insetos selecionados foram macerados individualmente em tubos de microcentrífuga de 1,5ml, contendo 160µl de tampão de extração. Logo depois, foi adicionado 20µl de SDS 10%, sendo essa solução homogeneizada e incubada por 30 minutos a 60°C.

Após a incubação e o resfriamento à temperatura ambiente, foi adicionado 50µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) na solução, seguida de centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de microcentrífuga de 1,5ml previamente identificado, onde foram acrescentados 300µl de etanol 96% e 80µl de acetato de amônio 7,5M. A solução, depois de homogeneizada por inversão, foi mantida em congelador a -20°C por 30 minutos, para precipitação do DNA.

As amostras foram, então, centrifugadas por 15 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 300µl de etanol 70%. Após uma nova centrifugação a 13000 rpm durante cinco minutos o sobrenadante foi novamente descartado e o microtubo com o precipitado foi seco em estufa a 37°C.

Para ressuspender o DNA, foram utilizados 50µl de TE (TrisHCl 0,5 M, EDTA 50 mM, Água MilliQ) e armazenado a -20°C.

4.8 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada com o espectrofotômetro NanoDrop™.

4.9 Amplificação gênica alelo específica do códon 1016

Para avaliar a presença da mutação, foram utilizados três iniciadores, um específico para o alelo mutante (5'-GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCA CAA ATT GTT TCC CAC CCG CAC CGG-3'), um específico para o alelo

selvagem (5'-GCG GGC ACA AAT TGT TTC CCA CCC GCA CTG A-3'), e o terceiro, comum (5'-GGA TGA ACC GAA ATT GGA CAA AAG C-3') (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009b).

As reações foram conduzidas em volume final de 25µl, contendo 2,5 µL de tampão 1X (já contendo MgCl₂), 12,5 pMoles de cada iniciador, 1,0 µL de dNTP mix (5 mM), 100 ng de DNA, 2U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e água MilliQ estéril qsp.

As reações foram modificadas a partir do protocolo descrito por Saavedra *et al.* (2007) utilizando-se os seguintes parâmetros de temperatura: desnaturação inicial a 95°C por doze minutos, 39 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 60°C por um minuto e extensão a 72°C por 30 segundos; seguidos de extensão final a 72°C por cinco minutos e um incremento de 65 °C para 95 °C numa taxa de 0,3 °C/s.

4.10 Verificação da amplificação do códon 1016

Para verificação de quais alelos foram amplificados, foi preparado um gel de poliacrilamida a 9% (Anexo 2), contendo 3,5µl de amostra da PCR, 1,5µl de marcador molecular (Blue Orange Loading Dye), além de 1,5µl do Ladder 25bp (Invitrogen). Após a eletroforese, o gel foi corado por 5 minutos em solução de brometo de etídio (0,1%), e transferido para o transiluminador para visualização de bandas. A presença de banda única 98bp indica indivíduo homozigoto dominante (suscetível); a presença de banda única 78bp indica indivíduo homozigoto recessivo (resistente); e a presença de duas bandas indica indivíduo heterozigoto (suscetível) (Figura 15).

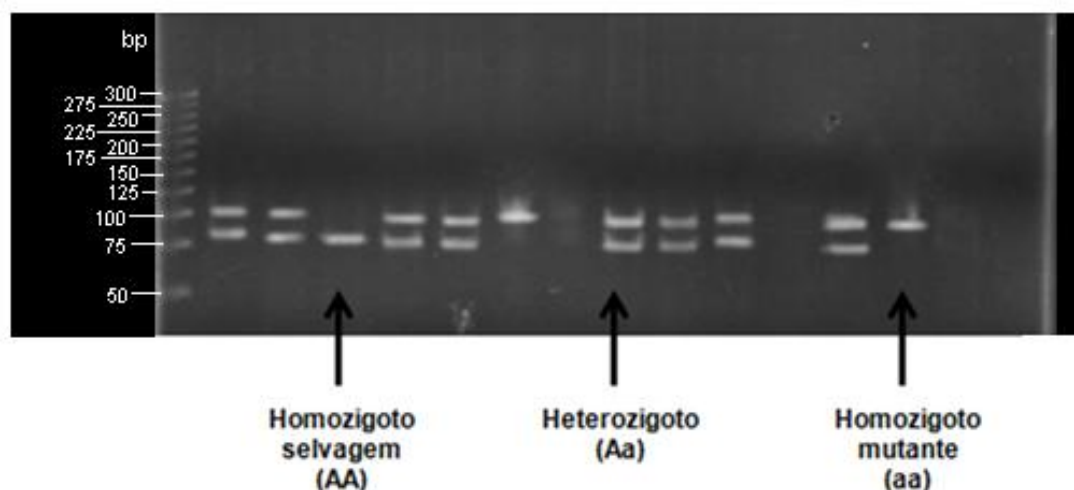


Figura 15. Verificação da amplificação do fragmento do gene que confere resistência a piretróides, na qual uma banda de 98bp indica homozigoto recessivo (aa - mutante), uma banda de 78 bp indica homozigoto dominante (AA - selvagem) e as duas bandas indicam heterozigoto.

4.11 Cálculos das frequências genotípicas e alélicas

A frequência genotípica ($f(x)$) representa a porcentagem de ocorrência de determinado genótipo (AA, Aa ou aa) em relação ao número total de indivíduos observados dentro de uma população, e foi calculada como:

$$f(x) = \frac{\text{número de indivíduos com genótipo } x}{\text{número total de indivíduos}}$$

A frequência alélica ($f(y)$) representa a porcentagem de ocorrência de determinado alelo (A ou a) em relação ao número total de alelos observados dentro de uma população. Como estamos tratando de um sistema dialélico (dois alelos para cada genótipo), esta frequência foi calculada como:

$$f(A) = \frac{2 \times \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo AA} + \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo Aa}}{2 \times \text{n}^\circ \text{ total de indivíduos}}$$

$$f(a) = \frac{2 \times \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo aa} + \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo Aa}}{2 \times \text{n}^\circ \text{ total de indivíduos}}$$

5. RESULTADOS

5.1 Dados Bioecológicos

Das 719 armadilhas de oviposição instaladas, 41% foram positivas, resultando em 11.896 ovos que originaram 5.857 adultos, sendo 4.267 *Aedes aegypti* e 1.586 *Aedes albopictus* (Tabelas VI e VII).

Dos 10 municípios cuja criação resultou em espécimes adultos, apenas Iguatu, Loanda e Nova Londrina não apresentaram coexistência de espécies. Ibaiti e Iguatu possuem predominância de *Aedes albopictus* (99,4% e 100%), Londrina possui um equilíbrio entre as espécies (53% *Aedes albopictus*), enquanto os outros oito municípios apresentam predominância de *Aedes aegypti*. A razão sexual observada foi a esperada (aproximadamente 1:1) para ambas as espécies em todas as localidades.

A positividade das paletas oscilou entre 2% e 100% (Tabela VI), com as menores taxas de positividade (menos de 10%) nos municípios de Ivaiporã, Iguatu e Pitanga, que apresentaram poucas ou nenhuma notificação de casos de dengue no período das coletas (Boletim Informativo Dengue 12/2008).

A porcentagem de eclosão das larvas ultrapassou 50% em metade das amostras. A média de eclosão para as paletas armazenadas por 15 dias foi 65,7%, apresentando um decréscimo para 32% e 20,8% de eclosão, respectivamente, para armazenamentos equivalentes a um e dois meses.

Tabela VI – Municípios do Estado do Paraná e respectivos números de ovitrampas instaladas, ovitrampas positivas, tempo máximo de armazenamento (sob condições de laboratório), número total de ovos, adultos e porcentagem de eclosão de *Aedes* spp.

Município	Ovitrampas Instaladas	Ovitrampas positivas (%)	Tempo de máximo de armazenamento	Ovos	% eclosão	Adultos
Iguatu	49	2 (4,1%)	15 dias	64	75,0	48
Guaíra	46	4 (8,7)	15 dias	40	87,5	35
Loanda	32	30 (93,7%)	2 meses	1186	22,2	263
Nova Londrina	30	28 (93,3%)	2 meses	1019	19,4	198
Ivaiporã	50	1 (2%)	1 mês	10	0	0
Pitanga	50	2 (4%)	1 mês	5	0	0
Maringá	140	57 (40,7%)	1 mês	2694	57,4	1546
Paranavaí	45	45 (100%)	1 mês	1751	42,6	746
Cianorte	47	26 (55,3%)	1 mês	2365	61,0	1443
Londrina	150	62 (41,3%)	15 dias	1685	63,9	1077
Ibaiti	30	19 (63,3%)	15 dias	787	41,3	325
Floraí	50	20 (40%)	15 dias	290	60,7	176
TOTAL	719	296 (41,2%)	-	11896	49,23	5857

Tabela VII - Municípios do Estado do Paraná e respectivos números e adultos, espécies, sexagem e razão sexual de *Aedes* spp.

Localidades	Adultos	<i>Ae. aegypti</i>	♂	♀	Razão sexual*	<i>Ae. albopictus</i>	♂	♀	Razão sexual*
Iguatu	48	0	0	0	-	48	25	23	0,48
Guaíra	35	33	19	14	0,42	2	2	0	1
Loanda	263	263	134	129	0,49	0	0	0	-
Nova Londrina	198	198	113	85	0,43	0	0	0	-
Ivaiporã	0	0	0	0	-	0	0	0	-
Pitanga	0	0	0	0	-	0	0	0	-
Maringá	1546	1247	683	564	0,45	295	152	143	0,48
Paranavaí	746	676	367	309	0,45	70	30	40	0,57
Cianorte	1443	1181	611	570	0,48	262	136	126	0,48
Londrina	1077	505	261	244	0,48	572	291	281	0,49
Ibaiti	325	2	0	2	1	323	173	150	0,46
Floraí	176	162	82	80	0,49	14	7	7	0,50
TOTAL	5857	4267	2270	1997	0,47	1586	816	770	0,48

* Razão sexual: número de fêmeas / número total

5.2 Dose diagnóstica, dose resposta e razão de resistência

A Dose Diagnóstica, estabelecida a partir da calibração da cepa suscetível Rockefeller com o inseticida temephos grau técnico foi de 0,016 ppm (mg/L). As populações avaliadas responderam de forma distinta quanto à classificação de status de suscetibilidade ao organofosforado.

5.2.1 Cianorte

Através do estabelecimento da colônia, foram obtidos ovos da geração F2 para realização dos bioensaios. O resultado (85,76% de mortalidade larval) indica que a amostra recebida está com suscetibilidade alterada ao inseticida utilizado (Tabela VIII).

A partir de bioensaios com concentrações múltiplas, foram encontradas CL_{50} e CL_{95} de, respectivamente 0,00905 e 0,02242 ppm, o que representa RR_{50} e RR_{95} de 2,66 e 3,56 (Tabela IX).

5.2.2 Maringá

Através do estabelecimento das colônias, foram obtidos ovos da geração F1 para realização dos bioensaios. O resultado (61,11% de mortalidade larval) indica que a amostra está resistente (Tabela VIII).

A partir de bioensaios com concentrações múltiplas, realizados apenas para *Aedes aegypti*, foram encontradas CL_{50} e CL_{95} de, respectivamente, 0,01059 e 0,03191 ppm; o que representa RR_{50} e RR_{95} de 3,98 e 7,18 (Tabela IX).

5.2.3 Paranavaí

Através do estabelecimento da colônia, foram obtidos ovos da geração F2 para realização dos bioensaios. O resultado (77,31% de mortalidade larval) indica que a amostra recebida está resistente (Tabela VIII). As CL_{50} e CL_{95} encontradas foram de, respectivamente, 0,01059 e 0,03191 ppm. As RR_{50} e RR_{95} foram de 3,11 e 3,97 (Tabela IX).

Tabela VIII - Bioensaios com a dose diagnóstica 0,0162mg/L (calibrada com a cepa Rockefeller) em larvas de *Ae. aegypti* provenientes dos municípios de Cianorte, Maringá e Paranavaí

Município	% Mortalidade (0,0162 mg/L)	Status
Cianorte	85,76	Suscetibilidade alterada
Maringá	61,11	Resistente
Paranavaí	77,31	Resistente

Tabela IX - Municípios do Estado do Paraná avaliados, gera o utilizada, concentra es letais (mg/L) e respectivos intervalo de confiança, chi-quadrado e razão de resistência (RR₅₀ e RR₉₅) em popula es em *Aedes aegypti*.

Município	Gera�o	CL ₅₀ (IC)	CL ₉₅ (IC)	X ²	RR ₅₀	RR ₉₅
Rockefeller	Fx	0,0034 (± 0,0001)	0,0063 (± 0,00026)	7,37	1	1
Cianorte	F2	0,00905 (± 0,00035)	0,02242 (± 0,00163)	4,17	2,66	3,56
Maringá	F1	0,01352 (± 0,00065)	0,04521 (± 0,00635)	10,96	3,98	7,18
Paranavaí	F2	0,01059 (± 0,00049)	0,03191 (± 0,00326)	9,46	3,11	3,97

5.3 Amplifica o do códon 1016.

A verifica o da amplifica o do fragmento do gene do canal de sódio que confere resistência a piretróides (códon 1016) se deu em géis de poliacrilamida (9%) ou agarose (4%). Suas fotos (anexo 3) resultaram em designa es de genótipos, fenótipos (anexo 4) e freq ncias alélicas (Tabelas X a XIII) das popula es analisadas (Figuras 16 e 17).

Tabela X – Regiões de Foz do Iguaçu com número de espécimes analisados e frequências genotípicas de *Aedes aegypti*.

Região	n total	Frequencia Genotípica		
		Val/Val (n) AA	Val/Ile (n) Aa	Ile/Ile (n) Aa
Norte	29	0.069 (2)	0.793 (23)	0.138 (4)
Sul	28	0.107 (3)	0.429 (12)	0.464 (13)
Leste	21	0.143 (3)	0.619 (13)	0.238 (5)
Oeste	38	0.053 (2)	0.789 (30)	0.158 (4)
Central	13	0.154 (2)	0.846 (11)	0 (0)

Tabela XI – Municípios avaliados com respectivos números de espécimes analisados e frequências genotípicas de *Aedes aegypti*.

Cidade	n total	Frequencia Genotípica		
		Val/Val (n) AA	Val/Ile (n) Aa	Ile/Ile (n) Aa
Foz do Iguaçu	129	0.105 (13)	0.695 (90)	0.200 (26)
Floraí	22	0.318 (7)	0.546 (12)	0.136 (3)
Loanda	15	0.133 (2)	0 (0)	0.867 (13)
Paranavaí	10	0.100 (1)	0.800 (8)	0.100 (1)
Londrina	23	0.348 (8)	0.435 (10)	0.217 (5)
Bandeirantes	26	0.269 (7)	0.462 (14)	0.269 (7)
Barra do Jacaré	19	0.211 (4)	0.578 (11)	0.211 (4)
Andirá	7	0 (0)	0.571 (4)	0.429 (3)

Tabela XII - Regiões de Foz do Iguaçu com respectivas frequências dos alelos selvagem (Val) e mutante (Ile) para a mutação no códon 1016 do fragmento do gene do canal de sódio de *Aedes aegypti*.

Região	Val (A)	Ile (a)
Norte	0.46	0.54
Sul	0.32	0.68
Leste	0.45	0.55
Oeste	0.45	0.55
Central	0.58	0.42

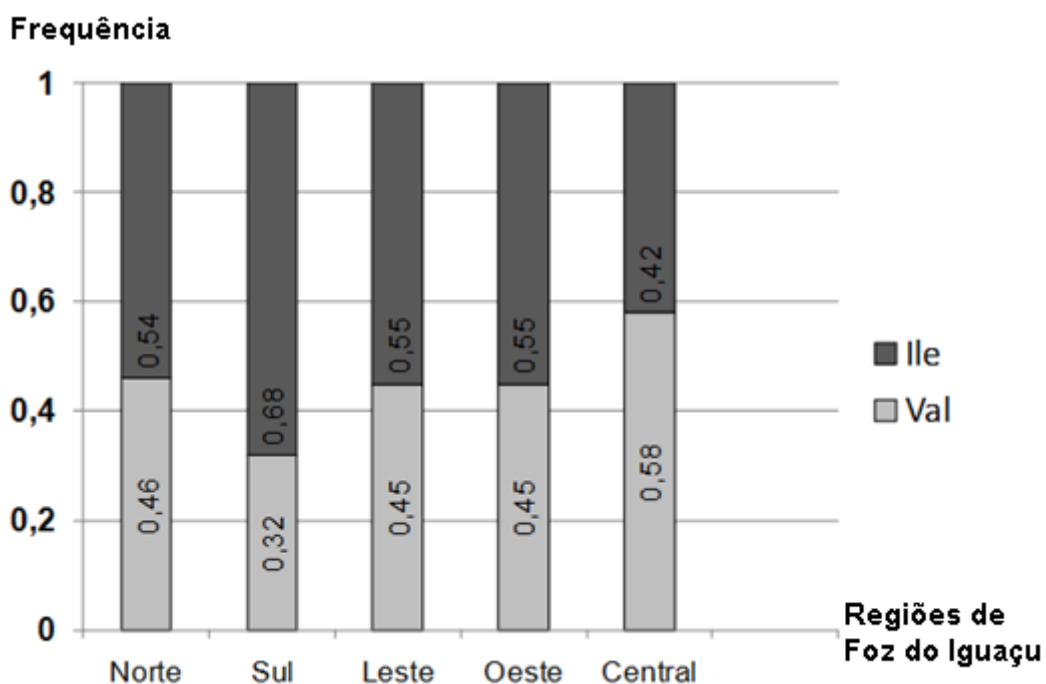


Figura 16 - Frequências dos alelos selvagem (Val) e mutante (Ile) para a mutação no códon 1016 do fragmento do gene do canal de sódio de *Aedes aegypti* nas cinco regiões de Foz do Iguaçu.

Tabela XIII - Municípios avaliados com respectivas frequências dos alelos selvagem (Val) e mutante (Ile) para a mutação no códon 1016 do fragmento do gene do canal de sódio de *Aedes aegypti*.

Região	Val (A)	Ile (a)
Foz do Iguaçu	0.45	0.55
Floraí	0.59	0.41
Loanda	0.27	0.73
Paranavaí	0.50	0.50
Londrina	0.56	0.44
Bandeirantes	0.50	0.50
Barra do Jacaré	0.50	0.50
Andirá	0.29	0.72

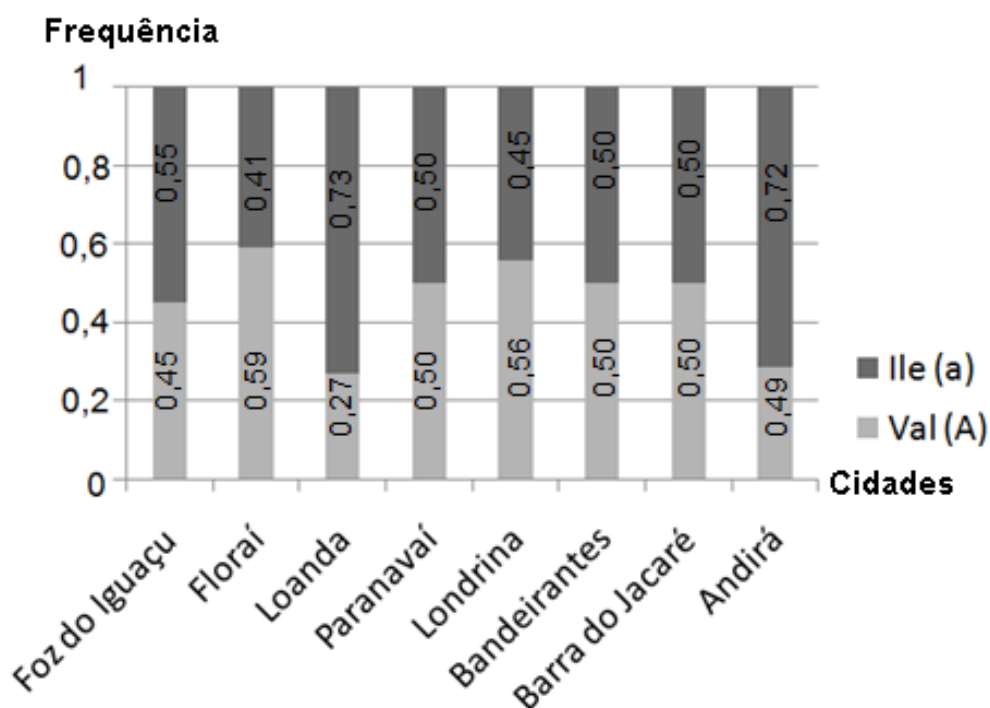


Figura 17 – Frequências dos alelos selvagem (Val) e mutante (Ile) para a mutação no códon 1016 do fragmento do gene do canal de sódio de *Aedes aegypti*, nos cinco municípios do Estado do Paraná avaliados.

DISCUSSÃO

6.1 Dados Bioecológicos

A Secretaria de Estado de Saúde do Paraná prioriza coleta de ovos de *Aedes* spp. em localidades que apresentem registros de casos de dengue ou presença dos vetores. Se observarmos a classificação dos municípios, feita para o primeiro semestre do ano de 2010 (figura 18), percebemos que a maioria dos municípios estudados apresenta elevadas taxas de urbanização.

Estes dados corroboram com Gluber (1998), Lagrotta *et al.*, (2008) e Mondini (2008), segundo os quais a ressurgência dos casos de dengue está fortemente associada com as mudanças demográficas dos últimos 50 anos, principalmente o crescimento populacional e a urbanização não planejada, que criaram condições ideais para a proliferação de vetores.

Duque (2008) aponta para outros fatores, além do tamanho da população urbana, como determinantes para a presença e/ou predominância do *Aedes aegypti*. Com exceção de Ibaiti, todos os municípios onde foram realizadas as coletas, assim como a maioria dos municípios com elevada taxa de incidência de casos, concentram-se na área do terceiro planalto, que registra as maiores médias anuais de temperatura para o Estado. Características climáticas, como temperatura, pluviosidade e umidade podem explicar a presença restrita dos vetores, já que o *Aedes aegypti* é favorecido por temperaturas altas e precipitações pluviométricas abundantes.

Os municípios de Pitanga e Ivaiporã, localizados em área predominantemente rural, foram os que apresentaram os menores números de paletas positivas e ovos, e cuja taxa de eclosão foi zero. O município de Iguatu, que apresenta equilíbrio entre população urbana (1.225 habitantes) e rural (1.027 habitantes) foi o único que apresentou apenas *Aedes albopictus*. Esses resultados estão de acordo com Chiaravalloti *et al.* (1997) e Gomes *et al.* (2005), que apontam para ocupação não uniforme de *Aedes albopictus* em áreas urbanas e maior incidência da espécie em áreas periféricas e rurais.

A presença das duas espécies no estado do Paraná aumenta o risco de transmissão de arbovírus, mas a probabilidade para que isso aconteça sempre dependerá, não somente da presença dos vetores, mas sobretudo de seus

hábitos e densidades. Deste modo, enfatiza-se novamente a importância de eliminar o vetor, principalmente através da diminuição de potenciais criadouros, fator no qual a colaboração da população é determinante.

Os ovos recebidos para a realização deste trabalho foram armazenados por, no máximo, 60 dias, e as taxas de eclosão foram similares às obtidas por Fantinatti *et al.* (2007), que obtiveram eclosão abaixo de 49% em todas as amostras, sendo que o tempo de armazenamento dos ovos desde a coleta foi heterogêneo e não ultrapassou 90 dias.

Apesar das coletas terem sido realizadas em 12 municípios, devido às baixas taxas de eclosão foram obtidas colônias suficientes para realização de bioensaios em apenas três localidades. Segundo Juliano *et al.* (2002), variáveis como temperatura, umidade, condições de transporte e tempo de armazenamento afetam a integridade e a taxa de eclosão de ovos de *Aedes aegypti*. Como a metodologia de criação em laboratório é padronizada, o estabelecimento de um método único de coleta, transporte e armazenamento dos ovos por todas as regionais de saúde do Estado poderiam garantir a obtenção de um maior número de indivíduos e, conseqüentemente, melhores resultados.

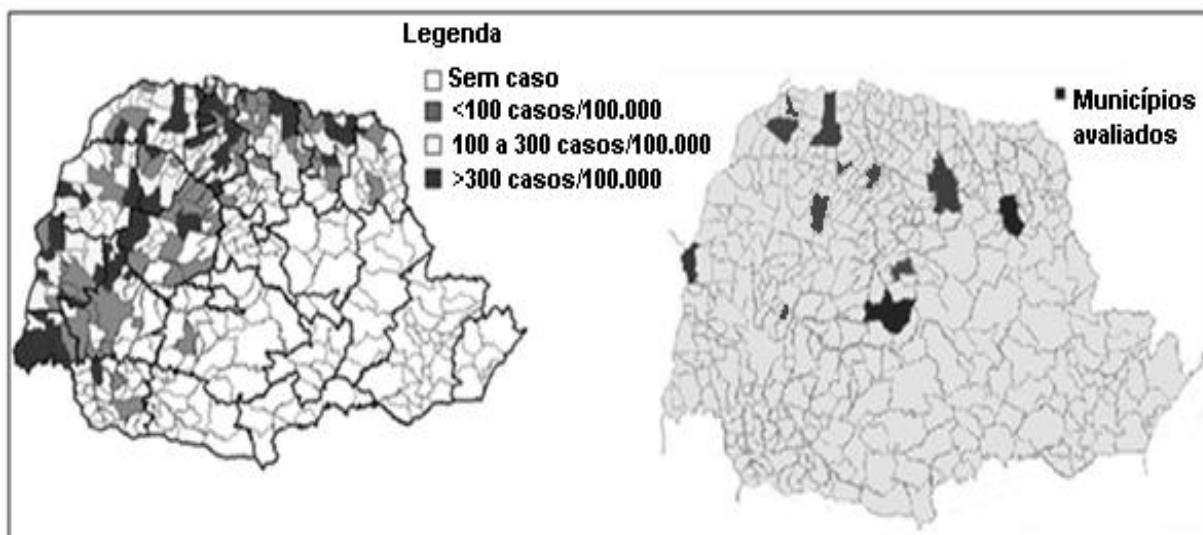


Figura 18 - Classificação dos municípios segundo incidência por 100.000 habitantes – Paraná 2010 (Boletim informativo dengue n° 4/2010) e mapa dos municípios avaliados (em detalhes na figura 8).

6.2 Dose diagnóstica, dose resposta e razão de resistência

A primeira consideração na escolha do inseticida a ser utilizado deve ser sua comprovada efetividade sobre a espécie alvo. Em 1999, a FUNASA iniciou o programa para avaliar a resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas. Desde então, vários municípios são avaliados, principalmente os que exibem níveis elevados de infestação ou de casos de dengue (Braga *et al.*, 2004).

Neste trabalho, a mortalidade observada a partir da concentração diagnóstica (86% em Cianorte, 77% em Paranavaí e 61% em Maringá) demonstrou que nenhuma das populações avaliadas encontra-se suscetível ao organofosforado temephos, indicando processo de estabelecimento de resistência e ineficácia do produto utilizado contra essas populações atualmente resistentes.

Os presentes resultados confirmam o que se tem verificado em outras regiões do país, como Alagoas, Rio de Janeiro e Sergipe (Braga *et al.* 2004), Ceará (Lima *et al.* 2006), Distrito Federal (Carvalho *et al.* 2004), Espírito Santo e Rio de Janeiro (Lima *et al.* 2003), Paraíba (Beserra *et al.* 2007), Paraná (Duque *et al.*, 2004, Duque 2008, Prophiro 2008), São Paulo (Campos & Andrade, 2001, Macoris *et al.* 1999, 2003).

De acordo com os critérios de Mazzari & Georghiou (1995) sobre as razões de resistência, Maringá (7,18) apresenta resistência moderada, enquanto Cianorte (3,56) e Paranavaí (3,97) apresentam baixa resistência. Duque (2008) encontrou resultados semelhantes para Maringá (6,9) e Paranavaí (3,4).

A análise da resistência aos inseticidas das populações de *Aedes aegypti* do Paraná é recente no âmbito de trabalhos acadêmicos, com Duque (2008) em Foz do Iguaçu, Paranavaí, Maringá, Ibiporã e Jacarezinho, e Prophiro (2008) em Foz do Iguaçu, sendo assim, o aumento significativo desses valores em apenas um ano de estudo são um indício da forte pressão seletiva ao vetor no Estado.

Assim como observado por Beserra *et al.* (2007), esses diferentes padrões de resistência observados para as populações podem estar associado ao histórico do uso do produto em cada município, com diferentes frequências de aplicações, submetendo-os a diferentes pressões de seleção e, conseqüentemente, valores distintos de razões de resistência.

A indicação de substituição do temephos por um inseticida alternativo ocorria quando a taxa de mortalidade da população exposta à dose diagnóstica

era menor que 80% e a razão de resistência fosse considerada alta (maior que 10). Porém, segundo os critérios definidos em 2006 pelo Grupo Técnico Assessor para o Programa de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas sugere-se esta substituição quando bioensaios demonstram mortalidade inferior a 70% com a dose diagnóstica ou razão de resistência maior que três (Reunião Técnica 2006). Neste contexto, como todos os municípios avaliados apresentaram razões de resistência (RR_{95}) maiores que três, a troca de inseticida para outro de modo de ação distinto do organofosforado pode resuzir a pressão de seleção a qual estas populações estão expostas.

Uma das melhores opções atualmente seriam os reguladores de crescimento (IGRs). Esses compostos, que atuam interferindo no desenvolvimento do inseto, alterando sua embriologia, pupação, diapausa e comportamento (Resende & Gama, 2006), têm se mostrado eficazes no controle de diferentes espécies-alvo, como *Culex* spp. e *Anopheles* spp. (Batra *et al.*, 2005).

Os análogos do hormônio juvenil, como methoprene e pyriproxifen, interferem no sistema endócrino, inibindo o desenvolvimento e a emergência dos adultos. Os inibidores de síntese de quitina, como diflubenzuron e novaluron, interferem na formação da cutícula cada vez que o inseto inicia a muda (Braga & Vale, 2007).

Para uma maior efetividade do programa de controle, além da substituição do larvicida, sugere-se que o acompanhamento do status de resistência ao organofosforado continue sendo feito a cada dois anos. Espera-se uma maior efetividade do programa de controle e que, após um período sem a utilização do temephos, ocorra recuperação da suscetibilidade da espécie alvo a essa classe de inseticida (Lima *et al.*, 2006).

A detecção de mudanças na suscetibilidade pode auxiliar no planejamento do manejo da resistência, bem como estratégias de controle que atuem de forma mais efetiva contra o vetor. Estratégias de educação ambiental e em saúde devem ser desenvolvidas para estimular a participação da população a minimizar o risco representado por criadouros potenciais.

6.3 Amplificação do códon 1016

Devido ao clima mais frio e aos baixos níveis de infestação predial (quantidade de imóveis onde se encontram imaturos do mosquito), a região sul brasileira apresenta poucos casos de dengue em comparação a outras partes do país, estando, assim, menos expostas aos inseticidas (Martins *et al.*, 2009a). Apesar disto, se considerarmos apenas o Paraná, vemos que o Estado possui não só elevados índices de infestação predial, como grande número de casos autóctones (Boletim da Dengue nº4/2010) e condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do vetor *Aedes aegypti*.

A presença da mutação no códon 1016 do fragmento do gene do canal de sódio em todas as regiões e municípios analisados sugere que o uso de piretróides está expondo as populações a intensas pressões de seleção.

O fenótipo resistente só é expresso em homozigose recessiva, e está presente em baixas frequências em todas as populações, com exceção de Loanda. Tais genes recessivos podem persistir em níveis baixos na população, sem serem detectados, mesmo se nenhuma pressão seletiva estiver presente. Assim, embora o uso do piretróide seja relativamente recente, está associado à utilização do DDT em décadas passadas, o que foi capaz de selecionar para a resistência a piretróides e reduzir a eficácia de adulticidas com este mecanismo de ação dentro de um curto período de tempo (Davies *et al.* 2008)

O predomínio de heterozigotos, observado em quase todas as regiões, eleva a frequência do alelo mutante em todas as regiões. Apesar da superioridade heterozigótica em relação aos dois genótipos, a seleção favorável ao aumento da frequência do heterozigoto é um objetivo nulo, já que o acasalamento entre indivíduos heterozigotos resulta em progênes com os três genótipos (Salman 2007). Desta maneira, se considerarmos o equilíbrio de Hardy-Weiberg (ausência de seleção, mutação, deriva genética e acasalamento preferencial), podemos determinar uma nova frequência gênica e genotípica após uma geração de acasalamento ao acaso (Tabela XIV). Deste modo, perceberemos que, ao contrário das frequências alélicas, as frequências fenotípicas são alteradas, proporcionando um aumento no número de indivíduos resistentes em quase todos os municípios/regiões (Tabelas XV e XVI).

Tabela XIV - Valor preditivo das frequências alélicas, de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg. Sendo p = frequência de A e q = frequência de a.

Genótipo	Frequência genotípica
AA	p^2
Aa	$2pq$
aa	q^2

Tabela XV - Frequências genotípicas estimadas após uma geração de acasalamento ao acaso de *Aedes aegypti* para as regiões de Foz do Iguaçu.

Região	Frequência Genotípica após uma geração		
	Val/Val	Val/Ile	Ile/Ile
Norte	0.21	0.50	0.29
Sul	0.10	0.44	0.46
Leste	0.20	0.50	0.30
Oeste	0.20	0.50	0.30
Central	0.34	0.49	0.17

Tabela XVI - Frequências genotípicas estimadas após uma geração de acasalamento ao acaso de *Aedes aegypti* para os municípios paranaenses.

Cidade	Frequência Genotípica após uma geração		
	Val/Val	Val/Ile	Ile/Ile
Foz do Iguaçu	0.20	0.49	0.30
Floraí	0.35	0.48	0.17
Loanda	0.07	0.40	0.53
Paranavaí	0.25	0.50	0.25
Londrina	0.31	0.50	0.19
Bandeirantes	0.25	0.50	0.25
Barra do Jacaré	0.25	0.50	0.25
Andirá	0.08	0.41	0.51

Localizada na região Oeste do Paraná, Foz do Foz do Iguaçu é uma das cidades que apresenta os maiores números de casos de dengue no Estado. Vários elementos podem contribuir para estes números, entre eles, a localização estratégica, o fato de ser um pólo de atração turística e as relações com as nações vizinhas, o que proporciona um elevado fluxo populacional. A somatória destes fatores pode contribuir com a elevada frequência de indivíduos resistentes aos piretróides na região sul, área da tríplice fronteira.

A presença e o aumento da frequência da mutação Val1016Ile já foi verificada em várias localidades do Brasil (Martins *et al.* 2009b) e das Américas (Rodriguez *et al.*, 2005; Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007; García *et al.*, 2009). A detecção dessas mutações no campo têm conseqüências graves para a sustentação do uso de piretróides no controle de mosquitos (Soderlund & Knipple, 2003; Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007,)), o que levanta novamente a questão da substituição por metodologias alternativas de controle, visando manter e restaurar a suscetibilidade aos piretróides.

Como a alteração Kdr não diminui a eficácia de outras classes de inseticidas (Soderlund & Bloomquist, 1990; Soderlund, 1997), recomenda-se que o acompanhamento dessas populações seja feito de modo continuado para a mutação Val1016Ile, bem como para outras mutações do canal de sódio que possam apresentar relação com a resistência a piretróides. Deste modo, pode ser criado um protocolo simples e de custo reduzido para verificação da existência de alelos mutantes nas populações, visando auxiliar no desenvolvimento de estratégias para o manejo da resistência.

7. CONCLUSÕES

As amostras de *Aedes aegypti* de Maringá e Paranavaí apresentam resistência ao organofosforado temephos.

A população de *Aedes aegypti* do município de Cianorte está com a suscetibilidade alterada ao temephos.

Como todos os municípios apresentam populações de *Aedes aegypti* com razões de resistência maiores que três, recomenda-se a troca do temephos por um inseticida de diferente mecanismo de ação.

Todas as regiões e municípios avaliados contam com a presença do alelo mutante Val1016Ile que, em homozigose recessiva, confere resistência a piretróides em *Aedes aegypti*.

As maiores frequências do alelo mutante foram observadas nas regiões Sul, Leste e Oeste de Foz do Iguaçu, e nos municípios de Loanda e Andirá.

O uso continuado de inseticidas de mesmo mecanismo de ação está expondo as populações de *Aedes aegypti* a intensa pressão de seleção, indicando a necessidade de acompanhamento da frequência de mutações no gene do canal de sódio paralelamente a realização de bioensaios para detecção de suscetibilidade aos piretróides. Informações que podem auxiliar na eficiência dos programas de controle do vetor.

REFERÊNCIAS

- Apperson, C. S., Georghiou, G. P. 1975. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. **J. Econ. Entomol.** **68 (2)**: 153-157.
- Batra, C. P., Mittal, P. K., Adak, T., Ansari, M. A. 2005. Efficacy of IGR compound Starycide 480 SC (Triflumuron) against mosquito larvae in clear and polluted water. **J. Vec. Borne Dis.** **42**: 109-116.
- Beserra, E. B., Fernandes, C. R. M., Queiroga, M. F. C. & Castro Jr, F. P. 2007. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. **Neotrop. Entomol.** **36 (2)**: 303-307.
- Bisset, J., Blanco, S., Braga, I., Coto, H., Masuh, H., Moncayo, A., Nathan, M., Orellano, P., Vázquez, J. C. & Zerba, E. 2005. Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti* **Red Latinoamericana de Control de Vectores**.
- Boletim Informativo da Dengue nº 12/2008. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/boletimdengue/BoletimDengue12_2008.pdf. Acessado em 12 de abril de 2010.
- Boletim Informativo da Dengue nº 4/2009. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/boletimdengue/2009/BoletimDengue04_2009.pdf. Acessado em 28 de maio de 2010.
- Boletim Informativo da Dengue nº 4/2010. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/boletimdengue/2010/BoletimDengue04_2010Corrigido.pdf. Acessado em 28 de maio de 2010.
- Borges, S. M. A. A. 2001. Importância Epidemiológica do *Aedes albopictus* nas Américas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 99p.
- Braga, I. A., Lima, J. B. P., Soares, S. S., Valle, D. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the state of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **99 (2)**: 199-203.
- Braga, I. A., Valle, D. 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde** **16 (4)**: 279-293.
- Brengues, C., Hawkes, N. J., Chandre, F., *et al.* 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. **Med. Vet. Entomol.** **17**: 87-94.
- Câmara, F. P., Theophilo, R. L. G., Santos, G. T., *et al.* 2007. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **49 (2)**: 192-196.

- Campos, J. & Andrade, C.F.S.. 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Rev. Saúde Públ.** **35**: 232-236
- Carroll, D., Toovey, S., Gompel, A. V. 2007. Dengue fever and pregnancy – A review and comment. **Travel Med. Infect. Dis.** **5**: 183-188.
- Carvalho, M do S.L. de, Caldas, E.D., Yoshizawa, M.A.C., Degalliers, N., Oliveira, C.& Knox, M.B.. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal, em 2000. **Inf. Epid. SUS** **10**: 41-43.
- Cheung, W. Y.; Hubert, N. & B. S. Landry. 1993. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **PCR Methods and Applications** **3**: 69-70.
- Chiaravalloti-Neto F. 1997. Descrição da colonização de *Aedes aegypti* na região de São José do Rio Preto, São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **30**: 279-85.
- Consoli, R. A. G. B. & Lourenço de Oliveira, R. 1994. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 228p.
- Davidson G, Zahar AR 1973. The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. **Bull WHO** **49**: 475-483.
- Davies, T. G. M., O'Reilly, A. O., Field, L. M., Wallace, B. A., Williamson, M. S. 2008. Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modeling. **Pest. Manag. Sci.** **64**: 1126-1130.
- Dietz, V.J., Gubler, D. J., Rigau-Pérez, J. G., *et al.* 1990. Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: Evaluation of a clinically based dengue surveillance system. **Am. J. Epidemiol.** **131**: 693–701.
- Donalísio, M. R., Glasser, C. M. 2002. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Rev. Bras. Epidemiol.** **5 (3)**: 259-279.
- Dong, K. 2007. Insect sodium channels and insecticide resistance. **Invert. Neurosci.** **7**: 17-30.
- Duque, J. E. L., Martins, M. F., Anjos, A. F., Kuwabara, E. F., Navarro-Silva, M. A. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil.
- Duque, J.E.L. 2008. **Descrição e análise de fatores epidemiológicos, vetoriais e do controle da dengue no Estado do Paraná, Brasil**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 150p.
- Fantinatti, E.C.S., J.E.L. Duque, A.M. Silva & M.A. Navarro-Silva. 2007. Abundance and aggregation egg of *Aedes aegypti* L. and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in the north and northwest of the State of Paraná, Brazil. **Neotropical Entomology** **36**: 960-965.
- Ferreira, M. L. B., Cavalcanti, C. G., Coelho, C. A., Mesquita, S. D. 2005. Manifestações neurológicas de dengue. **Arq. Neuropsiquiatr.** **63 (2-b)**: 488-493.

Finney, D. J. 1971. **Probit Analysis**. Cambridge University Press, 3rd Edition.

FISPQ - Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico. Temefós Fersol 1g. Disponível em: <<http://www.fersolna.com.br/fersol/fichas/fispq/temefos1g.pdf>>. Acessado em 21 de junho de 2010.

Forattini O.P. 1986. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. **Rev Saúde Pública** **20**: 244-245.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. 2001. Relatório de situação das atividades de epidemiologia, sistema de informação e entomologia relacionadas ao PEAa, no estado de Pernambuco.

García GP, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solis G, et al. 2009. Recent Rapid Rise of a Permethrin Knock Down Resistance Allele in *Aedes aegypti* in México. **PloS. Negl. Trop. Dis.** **3(10)**: e531.

Gilman, A. G. 2003. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

Gluber, D. J. 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clin. Microbiol. Rev.** **11 (3)**: 489-498.

Gomes, A. C., Souza, J. M. P, Bergamaschi, D. P., et al. 2005. Anthrophilic activity of *Aedes aegypti* and of *Aedes albopictus* in area under control and surveillance. **Rev. Saúde Pública** **39 (2)**: 1-5

Gubler, D. J. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends. Microbiol.** **10**: 100-103.

Guzmán, M. G., Kourí, G. 2002. Dengue: an update. **Lancet. Infect. Dis.** **2**: 33-42.

Halstead, S. B. 2004. Dengue fever/dengue hemorrhagic fever. **Infect. Dis.** 2nd edition, vol 2. 1681-1689pp.

Hammon, W. M., Sather, G. E. 1960. Virological findings in the 1960 hemorrhagic fever epidemic (dengue) in Thailand. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **13**: 629-641.

Hemingway J., Ranson, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annu. Rev. Entomol.** **45**:371-391.

Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., Ranson, H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **34**: 653-665.

Holmes E. C., Bartley L. M., Garnet G. P. 1998. The emergence of dengue past, present and future. **Emerging Infectors**. London: Academic Press. 301-325.

- Ibañez-Bernal, S., Briseno, B., Mutebi, J. P., Argot, E., *et al.* 1997. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. **Med. Vet. Entomol.** **11 (4)**: 305-309.
- IPARDES – Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. 2008. Grau de urbanização do Paraná. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/pdf/mapas/dimensao_social/grau_de_urbanizacao_2007.pdf>. Acessado em 10 de junho de 2010.
- Juliano, S.A., O'Meara, G. F., Morril, J. R., Cutwa, M.M. 2002. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. **Oecologia** **130**: 458-469.
- Karunaratne, S. H. P. P., Hemingway, J. 2001. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. **Bull. World Health Organization** **79**: 1060-1064.
- Lagrotta, M. T. F., Silva, W. C., Souza-Santos, R. 2008. Identification of key areas for *Aedes aegypti* control through geoprocessing in Nova Iguaçu, Rio de Janeiro State, Brazil. **Cad. Saúde Pública** **24 (1)**: 70-80.
- Lima, E. P., Oliveira-Filho, A. M., Lima, J. W. O., *et al.* 2006. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em Municípios do Estado do Ceará. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.** **39 (3)** 259-263.
- Lima, J. B. P.; Pereira da Cunha, M.; Silva-Jr, R. C. S.; Galardo, A. K. R.; Soares, S. S.; Braga, I. A.; Ramos, R. P. & Valle, D. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brasil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **62**: 329-333.
- Liu, Z., Valles, S. M., Dong, K. 2000. Novel point mutations in the German cockroach *para* sodium channel gene are associated with knockdown resistance (*Kdr*) to pyrethroid insecticides. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **30 (10)**: 991-997.
- Loughney, K., Kreber, R., Ganetzky, B. 1989 Molecular analysis of the *para* locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. **Cell** **58 (6)**: 1143-1154.
- Macoris, M. L. D., Andrighetti, M. T., Takaku, L., Glasser, C. M., Carbeloto, V. C., Bracco, J. E. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **98 (5)**: 703-708.
- Macoris, M. L. G., Andrighetti, M. T. M., Takaku, L., Glasser, C. M., Garbeloto, V. C., Cirino, V. C. B. 1999. Alteration in susceptibility response of *Aedes aegypti* to organophosphates in cities in the state of S. Paulo, Brazil. **Rev. Saúde Púb.** **33**: 521-522.
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F. *et al.* 1997. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. **Insect Mol. Biol.** **7 (2)**: 179-184

- Martins, A. J., Belinato, T. A., Lima, J. B. P., Valle, D. 2008. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. **Pest Manag. Sci.** **64**: 676-680.
- Martins, A. J., Lima, J. B. P., Peixoto, A. A., Valle, D. 2009a. Frequency of Val1016Ile mutations in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. **Trop. Med. Int. Health.** **14** (2): 1351-1355.
- Martins, A. J., Lins, R. M. M. A., Lins, J. G. B., Peixoto, A. A. & Valle, D. 2009b. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **81** (1): 108-115.
- Mathengue, E. M. *et al.* 2001. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. **J. Med. Entomol.** **38** (4):531-536.
- Mazzari, M.B & G.P. Georgio. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** **11**: 315-322.
- Melo, M. E. B., Merlo, K. C., Fernandes, R. R. C., *et al.* 2008. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temephos em células de medula óssea de camundongos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** **67** (3): 196-201.
- Mendonça, F. A., Paula, E. V., Oliveira, M. M. F. 2004. Aspectos sócio ambientais da expansão da dengue no Paraná. In: **Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Ambiente e Sociedade**. Encontro da Associação Nacional de Pós Graduação e Pesquisa em Ambiente e Sociedade. São Paulo, ANPPAS. p.1-13
- Ministério da Saúde. 1968. Endemias Rurais – Métodos de trabalho adotados pelo DNERu, Departamento Nacional de Endemias Rurais.
- Ministério da Saúde. FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). 2002. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. **Série A. Normas e Manuais Técnicos** **176**.
- Miretzki, M. 2003. Morcegos do Paraná, Brasil (Mammalia, Chiroptera): riqueza de espécies, distribuição e síntese do conhecimento atual. **Pap. Avulsos Zool.** **43** (6): 101-138. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0031-10492003000600001&script=sci_arttext>. Acessado em 5 de julho de 2010.
- Mondini, A., Chiaravalloti-Neto, F. 2008. Spatial correlation of incidence of dengue with socioeconomic demographic and environmental variables in a Brazilian city. **Sci Total Environ** **393**: 241-248.
- Narahasi T. 1992. Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. **Trends. Pharmacol. Sci.** **13**: 236-241.

- OPAS – Organización Panamericana de la Salud. 1995. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. OPAS. Washington. 116pp.
- Osanaí, C. H., Travassos-da-Rosa, A. P. A., Amaral, S., Passos, A. C. D., Tauil, P. L. 1983. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. **Ver Inst Med Trop São Paulo** 1: 53-54.
- PAHO – Pan American Health Organization. 2009. Number of reported cases of dengue & dengue hemorrhagic fever (DHF), region of the Americas (by country and subregion. Disponível em <<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2008.htm>>. Acessado em 21 de Junho de 2010.
- Paiva, M. H. S. 2006. Monitoramento do gente que codifica a esterase envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil. Dissertação de Mestrado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Recife.
- Periago, M. R., Guzmán, M. G. 2007. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. **Rev. Panam. Salud Públ.** 21: 187-191
- Pimenta Jr., F. G. 2005. Instrumento para avaliar a implantação do Programa Nacional de Controle do Dengue no âmbito municipal. **Dissertação de mestrado da Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, RJ.**
- Poletti, M., Omoto, C. 2003. Resistência de inimigos naturais a pesticidas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 30: 16-26.
- Prieto, A. V.; M. F. Suárez & R. Gonzalez. 2002. Susceptibilidad de dos poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Cali (Valle, Colombia) a Temefos (Abate®) y Triflumuron (Starycide®). **Rev. Colomb. Entomol.** 28 (2): 175-178.
- Prophiro, J. S. 2008. **Análise de susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) a organofosforado e alternativa de controle de imaturos do vetor *Aedes aegypti* utilizando produtos de origem botânica.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 120p.
- Reiter P, Amador MA, Colon N. Enhancement on the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. Journal of the American Mosquito Control Association 7:52-55, 1991.
- Resende, M. C., Gama, R. A. 2006. Persistência e eficácia do regulador de crescimento pyriproxyfen em condições de laboratório para *Aedes aegypti*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 39 (1): 72-75.
- Reunião técnica para discutir status de resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas. 2006. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue.

- Ribeiro, A. F., Marques, G. R. A. M., Voltolini, J. C., Condino, M. L. F. 2006. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. **Rev. Saúde Pública** **40** (4): 671-676.
- Ribeiro, P. C., Sousa, D. C., Araújo, T. M. E. 2008. Perfil clínico-epidemiológico dos casos suspeitos de dengue em um bairro da zona Sul de Teresina, PI, Brasil. **Rev. Bras. Enferm.** **61** (2): 227-232.
- Rodriguez, M.M., Bisset, J.A., De Armas, Y. and Ramos, F. 2005 Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. **J Am Mosq Control Assoc** **21**: 437–445.
- Rose, R. I. 2001. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerg. Infect. Dis.** **7** (1): 17-23.
- Saavedra-Rodriguez K., Urdaneta-Marquez L., Rajatileka S. et al. 2007 A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.** **16**, 785–798.
- Sabin, A. B. 1952. Research on dengue during World War II. **American J. Trop. Med. Hyg.** **1**: 30-50.
- Salman, A. K. D. 2007. Conceitos básicos de genética de populações. **Documentos** **118/ Embrapa Rondônia**. Porto Velho – RO.
- Santos, R.C. 2003. Updating of the distribution of *Aedes albopictus* in Brazil (1997- 2002). **Rev. Saúde Pública** **37**: 671-673.
- Santos, V. M. R., Donnici, C. L., DaCosta, J. B. N., Caixeiro, J. M. R. 2007 Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Quím. Nova** **30** (1): 159-170
- Santos, R. L. C., Fayal, A. S., Aguiar, A. E., Vieira, D. B. R., Póvoa, M. M. 2007b. Avaliação do efeito residual de piretróides sobre anofelinos da Amazônia brasileira. **Ver Saúde Pública** **41** (2): 276-83.
- Santos, M. A. T., Areas, M. A., Reyes, F. G. 2007c. Piretróides – uma visão geral. **Alim. Nutr.** **18** (3): 339-349.
- Schatzmayr H. G., Nogueira, R. M. R., Rosa, A. P. A. T. 1986. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. **Mem. Inst. OswaldoCruz** **81**: 245–246.
- Schlesinger, R. W., Frankel, J. W. 1956. Adaptation of the New Guinea B strains of dengue virus to suckling mice and to adults Swiss mice. **J. Immunol.** **77**: 351-363.
- Seneviratne, S. L., Malavige, G. N., de Silva, H. J. 2006. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. **T. Roy. Soc. Trop. Med. H.** **100**: 608-614.
- SESA-PE. Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco. 1997. Estruturação do Plano de Erradicação de *Aedes aegypti* no Brasil (PEAa), em Pernambuco, Recife.

- SESA-PR. Secretaria de Estado de Saúde do Paraná. 2010. Série Histórica da dengue – casos notificados e confirmados no Paraná de 1991 a 2008. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/boletimdengue/serie_historica_Dengue1991a2008.xls>. Acessado em 21 de Junho de 2010.
- Silva, A. M., Camargo, N. J., Santos, D. R., Massafra, R., *et al.* 2008. Diversidade, Distribuição e Abundância de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. **Neotrop. Entomol.** **37 (2)**: 209-225
- Singhi, S., Kisson, N., Bansal, A. 2007. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intense care unit. **J. Pediatr** **83 (2 Suppl)**: S22-35.
- Soderlund D. M., Bloomquist, J. R. 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. **Annu. Rev. Entomol.** **34**: 77-96.
- Soderlund, D. M., Knipple, D. C. 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **33**: 563–577.
- Soderlund, D.M., 1997. Molecular mechanisms of insecticide resistance. **Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals**. 21–56.
- Soderlund, D.M., Bloomquist, J.R., 1990. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Roush, R.T., Tabashnik, B.E. (Eds.), **Pesticide Resistance in Arthropods**. 58–96
- SUCEN – Superintendência de controle de endemias. 2010. Classificação de inseticidas. Disponível em: < <http://www.sucen.sp.gov.br/down/segtrb/sequi2.pdf> >. Acessado em 20 de Junho de 2010.
- SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. 2010. Informe Epidemiológico da Dengue, Análise da Situação e Tendências – 2010. Disponível em: http://new.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=917&Itemid=423. Acessado em 13 de junho de 2010.
- Taui P. L. 2002. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cad. Saúde Pública** **18**: 867-871.
- Taui, P. L. 2001. Urbanização e ecologia do dengue. **Cad. Saúde Pública** **17** (suplemento): 99-102.
- Teixeira M. G., Barreto, M. L., Guerra, Z. 1999. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do SUS** **8 (4)**: 5-33.
- Teixeira M. G., Barreto, M. L. 1996. Porque devemos, de novo, erradicar o *Aedes aegypti*. **Ciência & Saúde Coletiva** **1**: 122-35.
- Toledo, A. L. A., Escosteguy, C. C., Medronho, R. A., Andrade, F. C. 2006. Confiabilidade do diagnóstico final de dengue na epidemia de 2001-2002 no Município do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública** **22(5)**: 933-940.

- Vasconcelos, P.F.C., J.W.O. Lima, A.P.A.T. Rosa, M.J. Timbó, E.S.T. Rosa, H.R. Lima, S.G. Rodrigues & J.F.S.T. Rosa. 1998. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soro-epidemiológico aleatório. **Revista de Saúde Pública** 32: 447-454.
- WHO – World Health Organization. 1997. **Dengue haemorrhagic fever diagnosis treatment, prevention and control**. 2nd edition, Geneva.
- WHO – World Health Organization. 2007. WHO Specifications and evaluations for public health pesticides: temephos. Disponível em <http://www.who.int/whopes/quality/Temephos_eval_June_2007_corr_aug160807.pdf> Acessado em 15 de Junho de 2010.
- WHO – World Health Organization. 2009. Dengue, countries or areas at risk. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png> Acessado em 5 de junho de 2010.
- Wilder-Smith, A., Schwartz, E. 2005. Dengue in travelers. **N. Engl. J. Med.** 353 (9): 924-32.
- Williamson, M. S., Martinez-Torres, D., Hick, C. A., Devonshire, A. L. 1996. Identification of mutation in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticide. **Mol. Genet. Genomics** 252: 51-60.
- World Health Organization, 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva: World Health Organization, WHO/VBC/81.807.
- World Health Organization, 1992. Vector resistance to pesticides. Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. **WHO Technical Report Series** 818:1-62.WHO.

ANEXOS

1- Extração

Protocolo de Cheung *et al.* (1993) modificado por Carla F. Piccoli, Ana Caroline Dalla Bona, Rodrigo Faixa Chitolina e Adriana Lacerda Twerdochlib (2009)

1. Separar e identificar microtubos de 1,5 mL para cada mosquito a ser extraído;
2. Pegar o mosquito previamente congelado em álcool com auxílio de pinça de ponta fina; secá-lo em papel toalha e colocá-lo dentro do microtubo identificado;
3. Adicionar 160 µL da solução tampão em cada microtubo. (200mM Tris-HCl pH 8, 2M NaCl e 70mM EDTA)
4. Com auxílio de um pistilo autoclavado, macerar cada mosquito individualmente (utilizar um pistilo para cada mosquito para não contaminar);
5. Adicionar 20 µL de SDS
6. Colocar para incubar por meia hora a 60°C
7. Deixar resfriar a temperatura ambiente
8. Adicionar 50 µL de clorofórmio:álcool isoamílico;
9. Centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm;
10. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo já identificado de 1,5 mL.
11. Adicionar 80 µL de acetato de amônio 7,5M e 300 µL de etanol 96% em cada microtubo;
12. Homogeneizar as amostras por inversão;
13. Levar ao congelador a -20°C por meia hora para precipitação do DNA
14. Centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm
15. Descartar o sobrenadante
16. Lavar o precipitado adicionando 300 µL de álcool 70%
17. Centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm
18. Descartar o sobrenadante, cuidando para não descartar o *pelet*
19. Secar em estufa a 37°C
20. Ressuspender o DNA em 50 µL de TE

2 – Preparo gel poliacrilamida para verificação da amplificação do gene KDR

Preparo de solução de poliacrilamida 30%

Para preparar 100 mL de solução de poliacrilamida a 30%, devo dissolver 29g de acrilamida + 1g de bis-acrilamida em 60 mL de água destilada, após a dissolução, completar o volume para 100 mL e armazenar em frasco escuro na geladeira!
CUIDADO NA MANIPULAÇÃO. PRODUTOS TÓXICOS!

Preparo de solução de persulfato de amônio (P.A.) 10%

Dissolver 0,1g de persulfato de amônio em 1 mL de água destilada, armazenar em microtubos de 0,2 mL e deixar no freezer.

Preparo de gel de poliacrilamida a 9%

Para preparar 2 géis de poliacrilamida a 9%, com espaçadores de 1.5mm :

- 15 mL de água destilada
- 9 mL de solução de poliacrilamida a 30%
- 6 mL de TBE 5X
- 41 µL de Persulfato de amônio (10%)
- 100 µL de TEMED

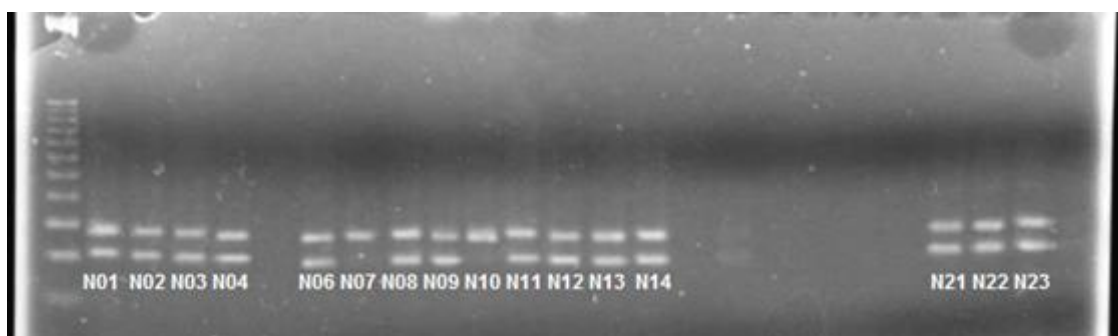
Realizar a eletroforese a 60V, 120 mA e 120W.

Pipetar 1,5 µL do tampão de carregamento + 3,5 µL da amostra de PCR ou 1,5 µL do ladder 25bp.

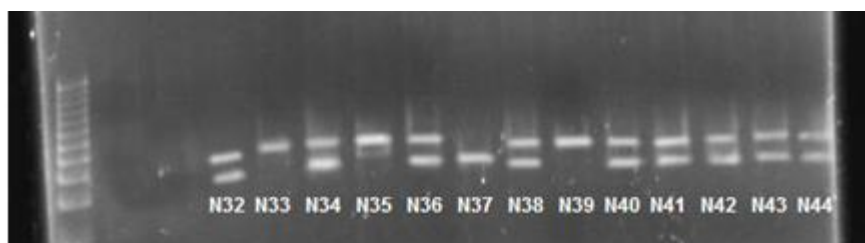
Corar por 5 minutos em brometo de etídio (1%).

3- Fotos resultantes das PCRs realizadas

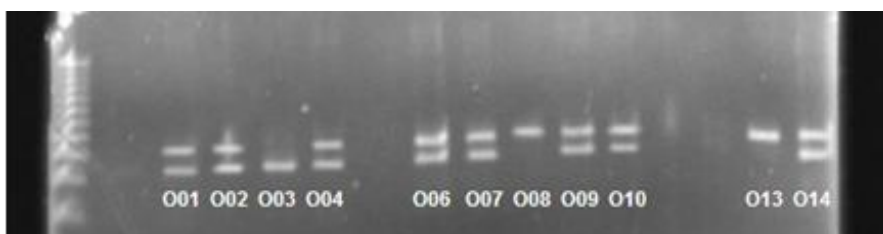
Foz do Iguaçu - Norte:



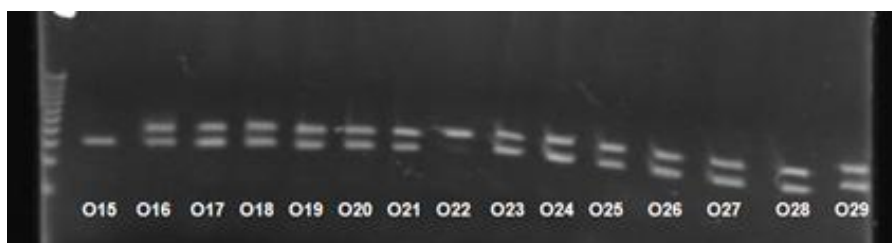
Foz do Iguaçu – Norte



Foz do Iguaçu – Oeste

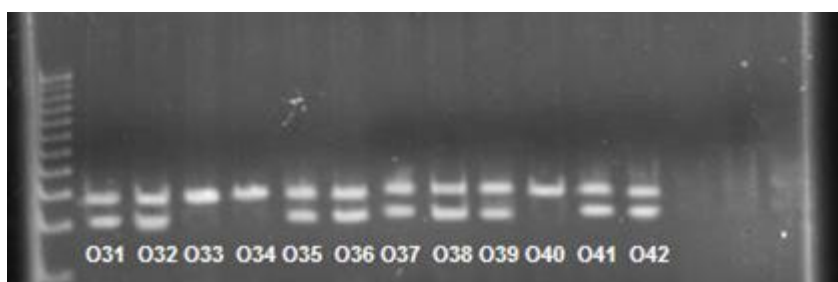


Foz do Iguaçu – Oeste

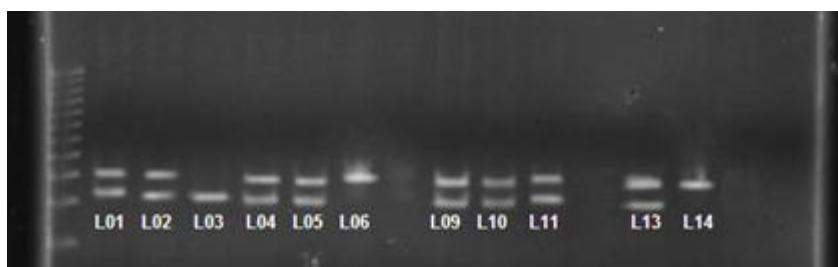


3- Fotos resultantes das PCRs realizadas (continuação).

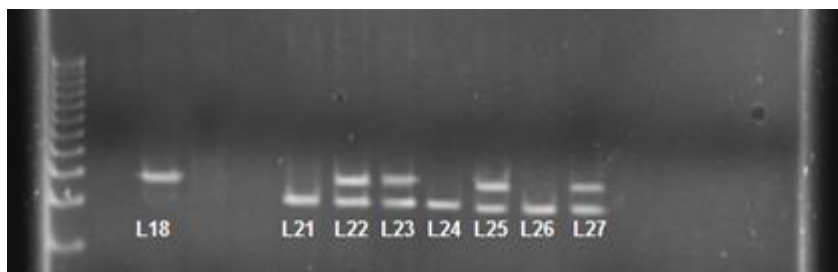
Foz do Iguaçu – Oeste



Foz do Iguaçu - Leste



Foz do Iguaçu - Leste



Foz do Iguaçu - Leste

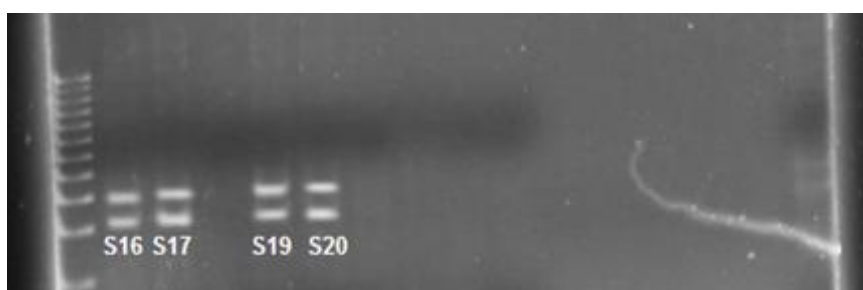


3- Fotos resultantes das PCRs realizadas (continuação).

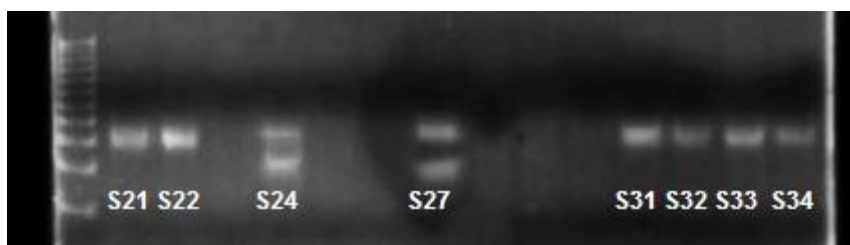
Foz do Iguaçu - Sul



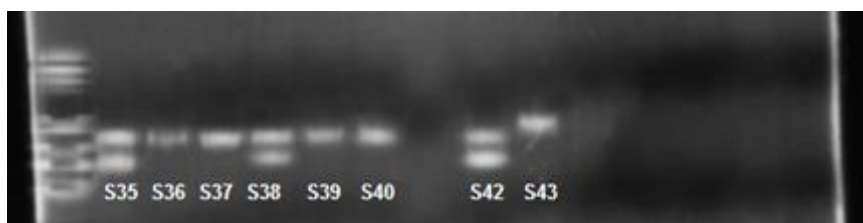
Foz do Iguaçu - Sul



Foz do Iguaçu - Sul

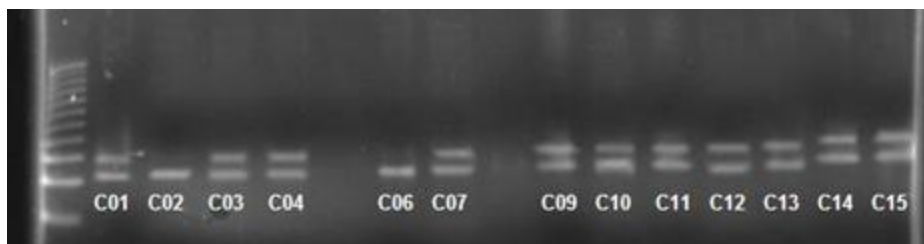


Foz do Iguaçu - Sul

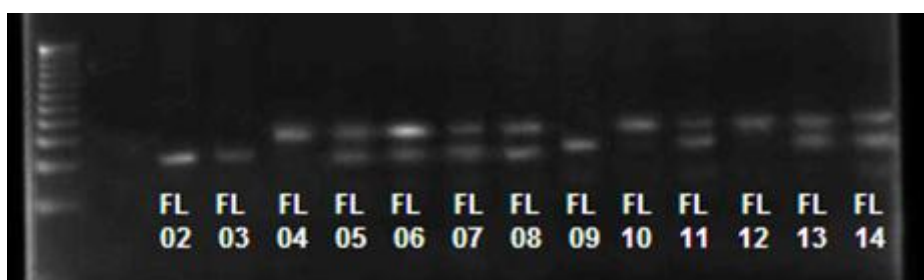


3- Fotos resultantes das PCRs realizadas (continuação).

Foz do Iguaçu - Central



Floraí



Floraí



Floraí, Loanda

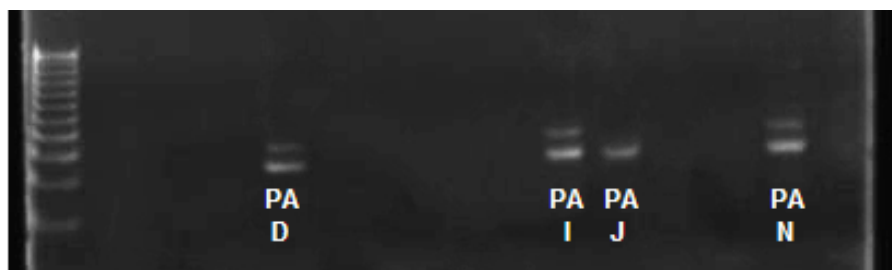


3- Fotos resultantes das PCRs realizadas (continuação).

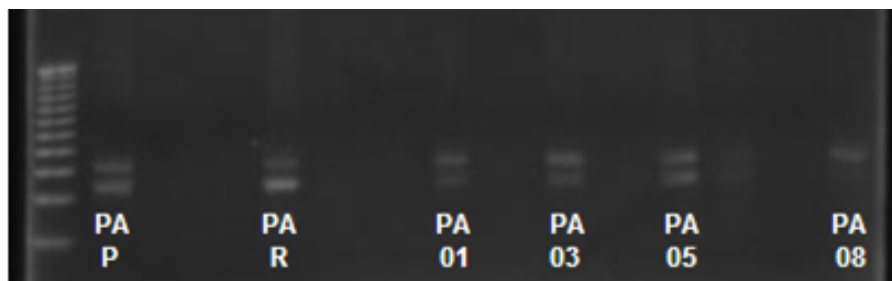
Loanda



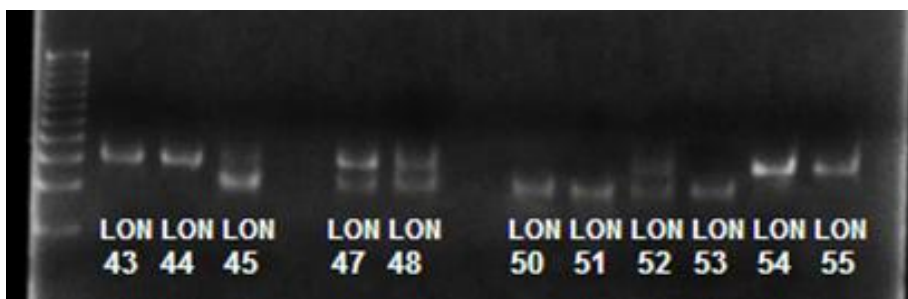
Paranavaí



Paranavaí

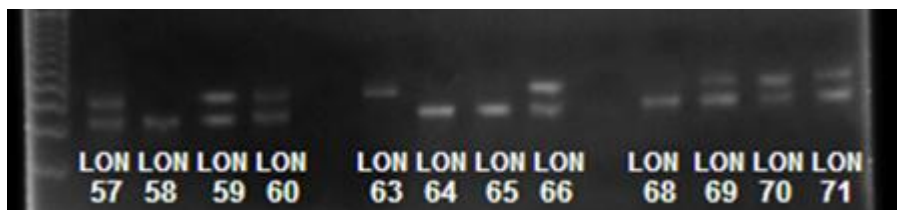


Londrina

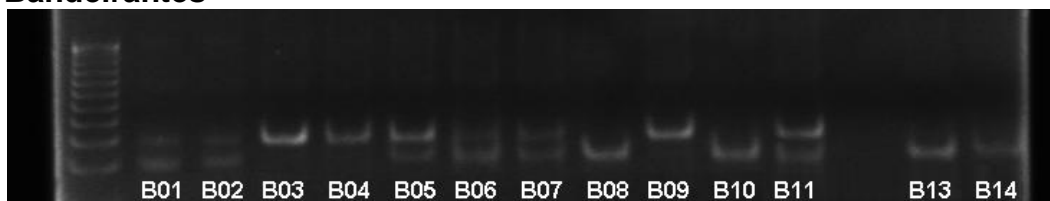


3- Fotos resultantes das PCRs realizadas (continuação).

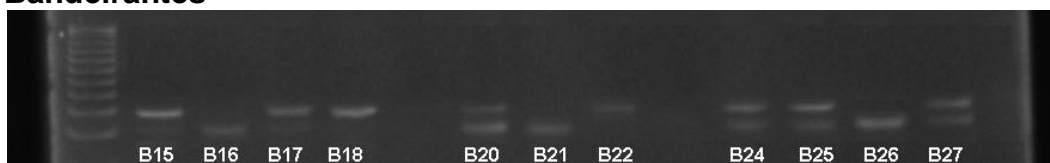
Londrina



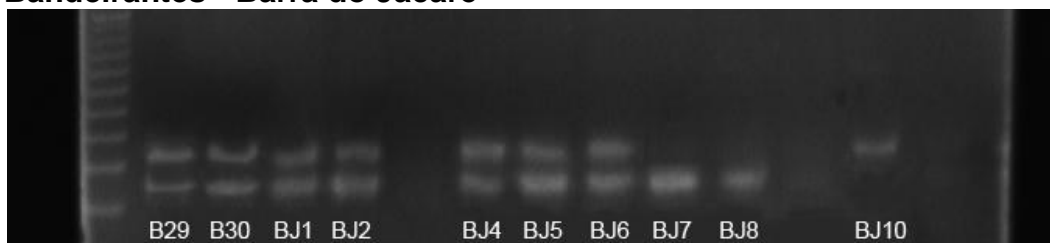
Bandeirantes



Bandeirantes



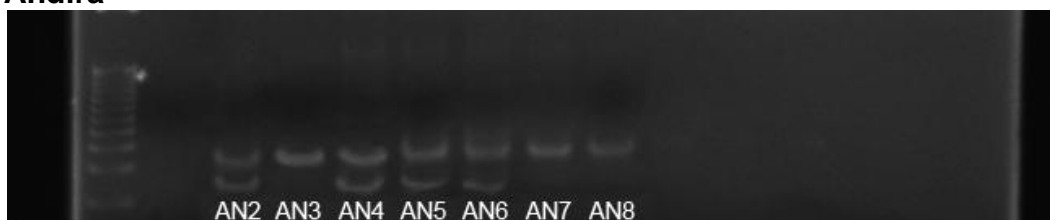
Bandeirantes - Barra do Jacaré



Barra do Jacaré



Andirá



4-Tabelas relacionando insetos extraídos e respectivos genótipos e fenótipos encontrados (listados apenas para as reações que geraram resultados).

Região	Número	Estrato	Sexo	Genótipo	Fenótipo
Norte	1	2	♀	Aa	Suscetível
Norte	2	2	♀	Aa	Suscetível
Norte	3	2	♀	Aa	Suscetível
Norte	4	2	♀	Aa	Suscetível
Norte	6	2	♀	Aa	Suscetível
Norte	7	2	♀	aa	Resistente
Norte	8	2	♀	Aa	Suscetível
Norte	9	2	♀	Aa	Suscetível
Norte	10	2	♀	AA	Suscetível
Norte	11	2	♂	Aa	Suscetível
Norte	12	2	♂	Aa	Suscetível
Norte	13	2	♂	Aa	Suscetível
Norte	14	2	♂	Aa	Suscetível
Norte	21	2	♂	Aa	Suscetível
Norte	22	2	♂	Aa	Suscetível
Norte	23	2	♂	Aa	Suscetível
Norte	32	2	♀	Aa	Suscetível
Norte	33	2	♀	aa	Resistente
Norte	34	2	♀	Aa	Suscetível
Norte	35	2	♀	aa	Resistente
Norte	36	2	♀	Aa	Suscetível
Norte	37	2	♂	AA	Suscetível
Norte	38	2	♂	Aa	Suscetível
Norte	39	2	♂	aa	Resistente
Norte	40	2	♂	Aa	Suscetível
Norte	41	2	♂	Aa	Suscetível
Norte	42	2	♂	Aa	Suscetível
Norte	43	2	♂	Aa	Suscetível
Norte	44	2	♂	Aa	Suscetível

4-Tabelas relacionando insetos extraídos e respectivos genótipos e fenótipos encontrados (continuação).

Região	Número	Estrato	Sexo	Genótipo	Fenótipo
Leste	1	5	♀	Aa	Suscetível
Leste	2	5	♀	Aa	Suscetível
Leste	3	5	♀	AA	Suscetível
Leste	4	5	♀	Aa	Suscetível
Leste	5	5	♀	Aa	Suscetível
Leste	6	5	♀	AA	Suscetível
Leste	9	5	♀	Aa	Suscetível
Leste	10	5	♀	Aa	Suscetível
Leste	11	9	♀	Aa	Suscetível
Leste	13	9	♀	Aa	Suscetível
Leste	14	9	♀	aa	Resistente
Leste	18	9	♀	aa	Resistente
Leste	21	9	♀	AA	Suscetível
Leste	22	9	♀	Aa	Suscetível
Leste	23	9	♀	Aa	Suscetível
Leste	24	9	♀	aa	Resistente
Leste	25	9	♀	Aa	Suscetível
Leste	26	5	♀	aa	Resistente
Leste	27	5	♀	Aa	Suscetível
Leste	47	5	♂	Aa	Suscetível
Leste	48	5	♂	aa	Resistente

Região	Número	Estrato	Sexo	Genótipo	Fenótipo
Centro	1	4	♀	Aa	Suscetível
Centro	2	4	♀	AA	Suscetível
Centro	3	4	♂	Aa	Suscetível
Centro	4	4	♂	Aa	Suscetível
Centro	6	4	♀	AA	Suscetível
Centro	7	4	♀	Aa	Suscetível
Centro	9	4	♀	Aa	Suscetível
Centro	10	4	♀	Aa	Suscetível
Centro	11	4	♀	Aa	Suscetível
Centro	12	4	♀	Aa	Suscetível
Centro	13	4	♀	Aa	Suscetível
Centro	14	4	♀	Aa	Suscetível
Centro	15	4	♀	Aa	Suscetível

4-Tabelas relacionando insetos extraídos e respectivos genótipos e fenótipos encontrados (continuação).

Região	Número	Estrato	Sexo	Genótipo	Fenótipo
Oeste	1	6	♂	Aa	Suscetível
Oeste	2	10	♂	Aa	Suscetível
Oeste	3	6	♀	AA	Suscetível
Oeste	4	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	6	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	7	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	8	10	♀	aa	Resistente
Oeste	9	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	10	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	13	10	♀	aa	Resistente
Oeste	14	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	15	10	♀	AA	Suscetível
Oeste	16	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	17	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	18	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	19	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	20	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	21	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	22	10	♀	aa	Resistente
Oeste	23	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	24	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	25	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	26	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	27	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	28	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	29	10	♀	Aa	Suscetível
Oeste	31	10	♂	Aa	Suscetível
Oeste	32	10	♂	Aa	Suscetível
Oeste	33	10	♂	aa	Resistente
Oeste	34	10	♂	aa	Resistente
Oeste	36	10	♂	Aa	Suscetível
Oeste	37	10	♂	Aa	Suscetível
Oeste	38	10	♂	Aa	Suscetível
Oeste	39	10	♂	Aa	Suscetível
Oeste	40	10	♂	Aa	Suscetível
Oeste	42	10	♂	aa	Resistente
Oeste	43	10	♂	Aa	Suscetível
Oeste	44	10	♂	Aa	Suscetível

4-Tabelas relacionando insetos extraídos e respectivos genótipos e fenótipos encontrados (continuação).

Região	Número	Estrato	Genótipo	Fenótipo
Sul	6	11	AA	Suscetível
Sul	7	11	Aa	Suscetível
Sul	8	11	Aa	Suscetível
Sul	9	11	AA	Suscetível
Sul	10	11	Aa	Suscetível
Sul	11	11	Aa	Suscetível
Sul	14	11	aa	Resistente
Sul	16	11	Aa	Suscetível
Sul	17	11	Aa	Suscetível
Sul	19	11	Aa	Suscetível
Sul	20	11	Aa	Suscetível
Sul	21	11	aa	Resistente
Sul	22	11	aa	Resistente
Sul	24	11	Aa	Suscetível
Sul	27	11	Aa	Suscetível
Sul	30	11	aa	Resistente
Sul	31	11	aa	Resistente
Sul	32	11	aa	Resistente
Sul	33	11	aa	Resistente
Sul	34	11	aa	Resistente
Sul	35	11	Aa	Suscetível
Sul	36	11	aa	Resistente
Sul	37	11	aa	Resistente
Sul	38	11	Aa	Suscetível
Sul	39	11	aa	Resistente
Sul	40	11	aa	Resistente
Sul	42	11	AA	Suscetível
Sul	43	11	aa	Resistente

4-Tabelas relacionando insetos extraídos e respectivos genótipos e fenótipos encontrados (continuação).

Cidade	Código	Genótipo	Fenótipo
Floraí	FL02	AA	Suscetível
Floraí	FL03	AA	Suscetível
Floraí	FL04	aa	Resistente
Floraí	FL05	Aa	Suscetível
Floraí	FL06	Aa	Suscetível
Floraí	FL07	Aa	Suscetível
Floraí	FL08	Aa	Suscetível
Floraí	FL09	AA	Suscetível
Floraí	FL10	aa	Resistente
Floraí	FL11	Aa	Suscetível
Floraí	FL12	aa	Resistente
Floraí	FL13	Aa	Suscetível
Floraí	FL14	Aa	Suscetível
Floraí	FL16	AA	Suscetível
Floraí	FL18	Aa	Suscetível
Floraí	FL19	AA	Suscetível
Floraí	FL20	AA	Suscetível
Floraí	FL24	Aa	Suscetível
Floraí	FL26	Aa	Suscetível
Floraí	FL28	AA	Suscetível
Floraí	FL29	Aa	Suscetível
Floraí	FL30	Aa	Suscetível

Cidade	Código	Genótipo	Fenótipo
Loanda	LOA03	aa	Resistente
Loanda	LOA04	aa	Resistente
Loanda	LOA05	AA	Suscetível
Loanda	LOA08	aa	Resistente
Loanda	LOA10	aa	Resistente
Loanda	LOA11	aa	Resistente
Loanda	LOA12	aa	Resistente
Loanda	LOA14	aa	Resistente
Loanda	LOA15	aa	Resistente
Loanda	LOA16	AA	Suscetível
Loanda	LOA17	aa	Resistente
Loanda	LOA18	aa	Resistente
Loanda	LOA19	aa	Resistente
Loanda	LOA20	aa	Resistente
Loanda	LOA21	aa	Resistente

4-Tabelas relacionando insetos extraídos e respectivos genótipos e fenótipos encontrados (continuação).

Cidade	Código	Genótipo	Fenótipo
Paranavaí	PA D	Aa	Suscetível
Paranavaí	PA I	Aa	Suscetível
Paranavaí	PA J	AA	Suscetível
Paranavaí	PA N	Aa	Suscetível
Paranavaí	PA P	Aa	Suscetível
Paranavaí	PA R	Aa	Suscetível
Paranavaí	PA01	Aa	Suscetível
Paranavaí	PA03	Aa	Suscetível
Paranavaí	PA05	Aa	Suscetível
Paranavaí	PA08	aa	Resistente

Cidade	Código	Genótipo	Fenótipo
Londrina	LON43	aa	Resistente
Londrina	LON44	aa	Resistente
Londrina	LON45	AA	Suscetível
Londrina	LON47	Aa	Suscetível
Londrina	LON48	Aa	Suscetível
Londrina	LON50	AA	Suscetível
Londrina	LON51	AA	Suscetível
Londrina	LON52	Aa	Suscetível
Londrina	LON53	AA	Suscetível
Londrina	LON54	aa	Resistente
Londrina	LON55	aa	Resistente
Londrina	LON57	Aa	Suscetível
Londrina	LON58	AA	Suscetível
Londrina	LON59	Aa	Suscetível
Londrina	LON60	Aa	Suscetível
Londrina	LON63	aa	Resistente
Londrina	LON64	AA	Suscetível
Londrina	LON65	AA	Suscetível
Londrina	LON66	Aa	Suscetível
Londrina	LON68	AA	Suscetível
Londrina	LON69	Aa	Suscetível
Londrina	LON70	Aa	Suscetível
Londrina	LON71	Aa	Suscetível

4-Tabelas relacionando insetos extraídos e respectivos genótipos e fenótipos encontrados (continuação).

Cidade	Código	Genótipo	Fenótipo
Bandeirantes	B01	Aa	Suscetível
Bandeirantes	B02	Aa	Suscetível
Bandeirantes	B03	aa	Resistente
Bandeirantes	B04	aa	Resistente
Bandeirantes	B05	Aa	Suscetível
Bandeirantes	B06	Aa	Suscetível
Bandeirantes	B07	Aa	Suscetível
Bandeirantes	B08	AA	Suscetível
Bandeirantes	B09	aa	Resistente
Bandeirantes	B10	AA	Suscetível
Bandeirantes	B11	Aa	Suscetível
Bandeirantes	B13	AA	Suscetível
Bandeirantes	B14	AA	Suscetível
Bandeirantes	B15	aa	Resistente
Bandeirantes	B16	AA	Suscetível
Bandeirantes	B17	aa	Resistente
Bandeirantes	B18	aa	Resistente
Bandeirantes	B20	Aa	Suscetível
Bandeirantes	B21	AA	Suscetível
Bandeirantes	B22	aa	Resistente
Bandeirantes	B24	Aa	Suscetível
Bandeirantes	B25	Aa	Suscetível
Bandeirantes	B26	AA	Suscetível
Bandeirantes	B27	Aa	Suscetível
Bandeirantes	B29	Aa	Suscetível
Bandeirantes	B30	Aa	Suscetível

4-Tabelas relacionando insetos extraídos e respectivos genótipos e fenótipos encontrados (continuação).

Cidade	Código	Genótipo	Fenótipo
Barra do Jacaré	BJ1	Aa	Suscetível
Barra do Jacaré	BJ2	Aa	Suscetível
Barra do Jacaré	BJ4	Aa	Suscetível
Barra do Jacaré	BJ5	Aa	Suscetível
Barra do Jacaré	BJ6	Aa	Suscetível
Barra do Jacaré	BJ7	AA	Suscetível
Barra do Jacaré	BJ8	AA	Suscetível
Barra do Jacaré	B10	aa	Resistente
Barra do Jacaré	BJ13	Aa	Suscetível
Barra do Jacaré	BJ14	Aa	Suscetível
Barra do Jacaré	BJ15	aa	Resistente
Barra do Jacaré	BJ16	aa	Resistente
Barra do Jacaré	BJ17	Aa	Suscetível
Barra do Jacaré	BJ18	Aa	Suscetível
Barra do Jacaré	BJ19	Aa	Suscetível
Barra do Jacaré	BJ20	AA	Suscetível
Barra do Jacaré	BJ21	aa	Resistente
Barra do Jacaré	BJ22	AA	Suscetível
Barra do Jacaré	BJ23	Aa	Suscetível

Cidade	Código	Genótipo	Fenótipo
Andirá	AN2	Aa	Suscetível
Andirá	AN3	aa	Resistente
Andirá	AN4	Aa	Suscetível
Andirá	AN5	Aa	Suscetível
Andirá	AN6	Aa	Suscetível
Andirá	AN7	aa	Resistente
Andirá	AN8	aa	Resistente